IMMUNOLOGISCHE ANALYSE DES HORMONHAUSHALTES KEIMENDER GERSTENKARYOPSEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

RAINER ATZORN

aus Bad Schwalbach

Bochum 1983

UNIV.
UTRECHT
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547222_0048

IMMUNOLOGISCHE ANALYSE DES HORMONHAUSHALTES KEIMENDER GERSTENKARYOPSEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

RAINER ATZORN

aus Bad Schwalbach

Bochum 1983

1. Referent : Privatdozent Dr. E.W.Weiler

2. Referent : Professor Dr.V.Blüm

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Material und Methoden	15
1.	Chemikalien und Geräte	15
1.1	Chemikalien	15
1.2.	Radiochemikalien	16
1.3.	Geräteliste	17
2.	Synthesen	18
2.1.	Kopplung von Gibberellinen an Proteine	18
2.2.	Derivatisierung von Gibberellinen	18
3.	Immunisierung und Gewinnung von Antikörpern	19
4.	Durchführung der Immuntests	21
4.1.	Radioimmuntests	21
4.2.	Enzymimmuntests	23
4.3.	Berechnung immunologischer Ergebnisse	23
5.	Herkunft und Behandlung des Pflanzenmaterials	25
5.1.	Liste der verwendeten Gerstensorten	25
5.2.	Behandlung der Gersten	26
5.2.1.	Sterilisation und Keimung von Gerstenkaryopsen	26
5.2.2.	Inkubation von embryofreien Karyopsen und Embryonen	26
5.2.3.	Inkubation isolierter Aleuronschichten	27
5.3.	Aufarbeitung des Pflanzenmaterials	27
5.3.1.	Extraktion der Phytohormone	27
5.3.2.	Dünnschichtchromatographische Trennung von Gibberellinen	28
5.3.3.	Hydrolyse von Gibberellin-konjugaten	30
5.3.4.	Bestimmung der Aktivität der α-Amylase	32
6.	Applikation von Abscisinsäure	33
6.1.	Versuche zur Keimungshemmung	33
6.2.	Fütterung radioaktiv markierter ABA	33

Seite

III.	Ergebnisse	35
1.	Synthese von Gibberellin-Immunogenen und markierter Gibberellinderivate	35
1.1.	Kopplung von Gibberellinen an Rinderserumalbumin	37
1.2.	Synthese radioaktiv markierter Gibberellinderivate	42
1.2.1.	Synthese von Gibberellin-17-Norketonen	44
1.2.1.	Reduktion der Gibberellin-17-Norketone	46
1.3.	Enzymmarkierung von Gibberellinen	48
2.	Aufbau von Radioimmuntests für GA_1, GA_3, GA_9	51
2.1.	Optimierung der Antigen-Antikörper-Reaktion	51
2.2.	Eigenschaften der Antiseren	52
2.3.	Empfindlichkeit der Gibberellin-Radioimmuntests	58
3.	Aufbau von Enzymimmuntests für GA_3 und GA_4	61
3.1.	Optimierung der Antigen-Antikörper-Reaktion	61
3.2.	Eigenschaften der Antikörper	65
3,3.	Empfindlichkeit der Gibberellin-Enzymimmuntests	66
4.	Spezifität, Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Immuntests	68
4.1.	Untersuchungen zur Spezifität der Tests	70
4.2.	Ausarbeitung spezifischer Analysemethoden für die Immuntests und deren Genauigkeit und Reproduzierbarkeit	79

Seite

5. Untersuchungen zum Hormonhaushalt keimender Gerstenkaryopsen 88

5.1. Vergleichende Untersuchungen des Gibberellingehaltes und der Aktivität der ∝-Amylase 88

5.1.1. Wahl geeigneter Versuchsbedingungen 90

5.1.2. Kinetikder Aktivität der ∝-Amylase und des Phytohormonspiegels verschiedener Gerstenvarietäten 93

5.1.2.1. Hordeum vulgare L.cv.Himalaya (Bochum 1978) 93

5.1.2.2. Hordeum vulgare L.cv.Himalaya (Bochum 1982) 99

5.1.2.3. Sonstige analysierte Gerstensorten 102

5.1.3. Versuche mit isolierten Embryonen 109

5.1.4. Inkubation vom Embryo getrennter Karyopsen und isolierter Aleuronschichten 113

5.1.5. Gibberellinkonjugate in Gerstenkaryopsen 125

5.2. Untersuchungen zum Metabolismus der Abscisinsäure in keimenden Gerstenkaryopsen 127

5.2.1. Hemmung der Keimung von Gerstenkaryopsen durch Abscisinsäure 128

5.2.2. Radioimmunologische Messungen von ABA und Konjugaten 130

5.2.2.1. Keimende Karyopsen 130

5.2.2.2. Isolierte Embryonen 132

5.2.3. Metabolismus radioaktiver ABA in Hordeum vulgare L.cv.Himalaya 132

5.2.5. Hemmung der Aktivität der ∝-Amylase in embryolosen Karyopsen durch Abscisinsäure 137

IV. Diskussion 138

V. Zusammenfassung 160

Literaturverzeichnis 163

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ABA	Abscisinsäure
AP	alkalische Phosphatase
B	antikörpergebundene Form des markierten Antigens
B_o	maximal gebundene Aktivität in Abwesenheit von unmarkiertem Antigen
BHT	Butylhydroxytoluol
cpm	Zählrate (counts per minute)
Ci	Curie (1 Ci = 2.22×10^{12} dpm)
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
dpm	absolute Zählrate (desintegrations per minute)
EDC	1 -Äthyl-3-(3)-dimethyl-aminopropyl-carbodiimid·HCl
EIA	Enzymimmuntest (enzyme immunoassay)
F	nicht antikörpergebundene Fraktion des markierten Antigens
FG	Frischgewicht
GA	Gibberellin (gibberellic acid)
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektroskopie
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (high pressure liquid chromatography)
IES	Indolessigsäure
IgG	Immunglobulin G
IPA	Isopentenyladenosin
KR	Kreuzreaktion
MES	2(N-Morpholino)äthansulfonsäure
PBS	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
RIA	Radioimmuntest (radioimmunoassay)
RSA	Rinderserumalbumin
T	Tritium
TBS	Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
U	Units
UB	unspezifische Bindung

I. Einleitung

"Endokrine (hormonale) Regulationssysteme sind dadurch gekennzeichnet, daß von endokrinen oder neuroendokrinen Zellen Signalstoffe (Hormone) in den Blutstrom abgegeben werden, die an den Erfolgsorganen auf spezifische Rezeptoren treffen und dadurch Stoffwechselvorgänge oder morphologische Veränderungen steuern."

Diese Charakterisierung der Wirkungsweise von Hormonen durch KARLSON(1982) trifft im tierischen Organismus für sehr viele Gruppen chemischer Botenstoffe zu. In höheren Pflanzen werden Substanzen vergleichbarer regulatorischer Funktion als "Phytohormone" (WENT und THIMANN, 1937) bezeichnet. Übereinstimmend werden fünf Klassen von Phytohormonen unterschieden, die vorwiegend Wachstum und Entwicklung in der Pflanze beeinflussen und in geringen Konzentrationen vorkommen (BEARDER, 1980): Auxine, Gibberelline, Cytokinine, Abscisinsäure und Äthylen. Die Gleichsetzung der Wirkungsweise dieser Substanzen mit der tierischer Hormone hat allerdings Modellcharakter: So ist es z.B. bisher nicht gelungen, die Biosynthese eines Wirkstoffes in dazu spezialisierten Teilen der Pflanze und eine Diffusion zum Wirkort mit zuverlässigen Methoden der biochemischen Analytik nachzuweisen (LETHAM et al., 1978).

Zu den frühesten beobachteten Wirkungen chemischer Substanzen auf das Wachstum höherer Pflanzen gehört das durch den Pilz Gibberella fujikuroi Saw.Wr. (imperfekte Form: Fusarium moniliforme Sheld) hervorgerufene verstärkte Längenwachstum von Reiskeimlingen, die sogenannte "Bakanae-Krankheit" (KUROSAWA, 1926; zit. nach GRAEBE und ROPERS, 1978). Nachdem mit einem sterilen Filtrat des Pilzes der-

selbe Effekt von Kurosawa an den Reispflanzen erzielt werden konnte,versuchten vor allem in Japan Wissenschaftler die wirksame Substanz zu isolieren (z.B. YABUTA und HAYASHI, 1939).Die vollständige Strukturaufklärung eines Gibberellins,der Gibberellinsäure (GA_3), gelang erstmals CROSS et al. (1959). Die ersten, die das Vorkommen eines Gibberellins,nämlich GA_1, in höheren Pflanzen mit Biotests nachwiesen,waren WEST und PHINNEY (1959); die Strukturaufklärung der GA_1 nach Isolierung aus Extrakten höherer Pflanzen gelang MacMILLAN et al. (1960).Diese Befunde deuteten an , daß Gibberelline nicht nur in Gibberella fujikuroi, sondern auch in höheren Pflanzen generell verbreitet sind.Von den in einem Übersichtsartikel von BEARDER (1980), aufgeführten 57 Gibberellinen waren 45 auch in höheren Pflanzen,vor allem in Leguminosensamen, identifiziert worden.Das zuletzt in der Literatur publizierte Gibberellin,GA_{62}, wurde von KIRKWOOD und MacMILLAN (1982) beschrieben.

Aufgrund ihrer biosynthetischen Herkunft sind Gibberelline tetrazyklische Diterpene (vgl. GRAEBE und ROPERS, 1978).Charakteristisch für ihre chemische Struktur ist das Gibban-Skelett (GROVE und MULHOLLAND,1960),zu sehen in Abbildung 1 (a). Einem Vorschlag von MacMILLAN und TAKAHASHI (1968) folgend , wird bei der Numerierung der C-Atome von C_{19}- und C_{20}-Gibberellinen das ent-Gibberellangerüst als Grundlage genommen (Abbildung 1 (b)):

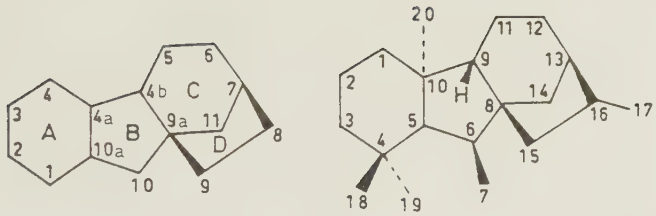


Abbildung 1: Gibbanskelett (a) und ent-Gibberellangerüst (b)

Gibberellinen wird bei vielen Wachstums- und Entwicklungsvorgängen höherer Pflanzen eine Beteiligung zugeschrieben, z.B. bei der Internodienstreckung (McCOMB, 1967), der Induktion der Blütenbildung (MICHNIEWICZ und LANG, 1962), der Brechung der Knospen- und Samenruhe (JONES, 1973) und der Steuerung von Keimungsprozessen (PALEG, 1965).

Die Funktion der Gibberelline bei der Freisetzung hydrolytischer Enzyme in keimenden Gerstenkaryopsen war und ist Gegenstand vieler Untersuchungen im Bereich der Physiologie pflanzlicher Wuchsstoffe (vgl. dazu BRIGGS, 1973; KHAN und TAO, 1978).

Schon 1890 fand HABERLAND, daß der Embryo für die Stärkehydrolyse im Endosperm notwendig ist. PALEG (1960) und YOMO (1960) konnten unabhängig voneinander erstmals demonstrieren, daß vom Embryo getrennte Gerstenkaryopsen nach

Inkubation mit Gibberellinsäure wesentlich mehr α-Amylase produzierten als entsprechende Kontrollen, die nicht mit dem Hormon behandelt worden waren. Sie fanden darüber hinaus mit Hilfe von Biotests Gibberellinaktivität im Embryo, was auch von anderen Experimentatoren (McLEOD und PALMER, 1966 ; YOMO und IINUMA, 1966; RADLEY, 1967) bestätigt werden konnte. Diese Daten gaben Grund zur Annahme, daß Gibberelline, und zwar vorwiegend GA_3 und GA_1, die wirksamen Substanzen bei der Induktion der α-Amylase in Gerstenkörnern seien. Da wie schon erwähnt vom Embryo getrennte Karyopsen ohne Gibberellin nur geringe α-Amylaseaktivität zeigten, lag die Vorstellung nahe, daß in vivo Gibberelline im Embryo synthetisiert und nach Diffusion ins Endosperm dort die Steigerung der α-Amylaseaktivität bewirken könnten.

Das Endosperm setzt sich zusammen aus dem Stärkeendosperm und der Aleuronschicht, die von der Samenschale (Testa) umgeben wird und eine proteinhaltige schmale Zellschicht ist. CHRISPEELS und VARNER (1967a) isolierten Aleuronschichten und inkubierten sie in GA_3-haltiger Lösung. Sie fanden gegenüber Kontrollen ohne Hormon eine Steigerung der α-Amylaseaktivität. Daraus wurde gefolgert, daß die Aleuronschicht in keimenden Gerstenkaryopsen der Ort der α-Amylase-Induktion sein müsse.

Daß die Steigerung der Enzymaktivität in Gegenwart von Gibberellinsäure auf de-novo Synthese der α-Amylase zurückzuführen ist, bewiesen FILNER und VARNER (1967): Sie kultivierten GA_3-behandelte Aleuronschichten in dichtemarkiertem Wasser ($H_2{}^{18}O$) und fanden den Einbau von ^{18}O in das Enzym. Dieser Einbau konnte nur über einen Austausch des schweren Isotops mit dem Sauerstoff der Carboxylgruppen freier Aminosäuren und anschließende Peptidsynthese möglich gewesen sein. Des weiteren konnte in isolierten Aleuronschichten ein Anstieg der Synthese von α-Amylase-

spezifischer Messenger-RNA nach Gibberellin-Behandlung demonstriert werden (HIGGINS et al. 1976; MOZER, 198o). Diese und andere Versuche (z.B. JACOBSEN und ZWAR, 1974; HO und VARNER, 1974) gaben Grund zu der Annahme, daß Gibberelline endogen die Produktion hydrolytischer Enzyme auf die gleiche Weise steuern (vgl. dazu AKAZAWA und MIYATA, 1982). Mittlerweile ist bekannt, daß in Aleuronschichten der Gerste zwei Gruppen von α-Amylase-Isoenzymen existieren (JACOBSEN und HIGGINS, 1982 ;BROWN und JACOBSEN, 1982), von denen angenommen wird, daß sie Produkte der Expression zweier verschiedener Gene oder Gengruppen sind.

Auch über den Einfluß von Gibberellinsäure auf Produktion und Sekretion anderer hydrolytischer Enzyme in Gerstenkaryopsen gibt es umfangreiche Untersuchungen (s. dazu TOMOS und LAIDMAN, 1979). Danach sollen bei α-Amylase, Proteasen, α-Glucosidase und Zellwandhydrolasen sowohl Enzymsynthese als auch Sekretion ins Stärkeendosperm gibberellingesteuert sein, während dem Hormon z.B. bei saurer Phosphatase und Ribonucleasen nur ein Einfluß auf die Sekretion zugeschrieben wird.

Die hier angeführten Daten machen es verständlich, daß in der Funktion von Gibberellinen auf die Induktion hydrolytischer Enzyme in keimenden Gerstenkaryopsen ein klassisches Modell für die Wirkungsweise eines Phytohormons gesehen wird (z.B. YOMO und VARNER, 1971). Auf Abbildung 2 sind einige Aspekte der Theorie in einem Schema dargestellt, das folgendermaßen zusammengefaßt werden kann:

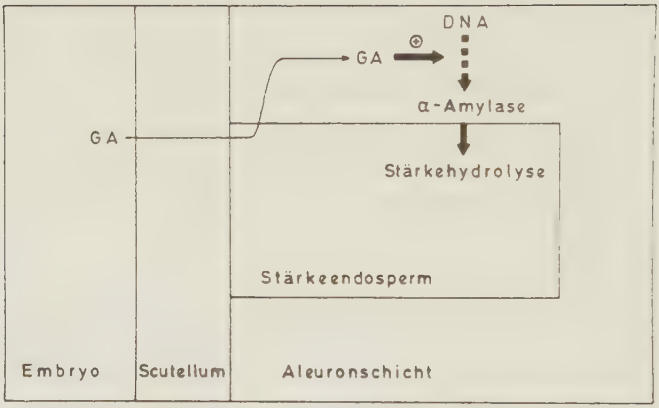


Abbildung 2: Durch Gibberellin(GA) induzierte Synthese und Sekretion hydrolytischer Enzyme in keimenden Gerstenkaryopsen.

Gibberelline werden im frühen Stadium der Keimung im Embryo gebildet und diffundieren in die Aleuronschicht. Dort induzieren sie die de-novo Synthese der α-Amylase und anderer hydrolytischer Enzyme und bewirken ihre Sekretion ins Stärkeendosperm. Die Aufgabe dieser Enzyme ist die Mobilisierung von Reservestoffen, welche der Embryo für die energieaufwendigen Keimungsprozesse benötigt.

In der Mehrzahl der oben angeführten Experimente zur Induktion der α-Amylase wurde GA_3 zu Karyopsen, von denen der Embryo entfernt war, oder zu isolierten Aleuronschich-

ten gegeben. Diese Induktionsexperimente konnten zwar Aufschluß über die Regulation des Enzyms geben, sagten aber wenig darüber aus, welche Gibberelline endogen vorkommen und wirksam sind.

Bestimmungen von Gibberellinen in keimenden Gerstenkaryopsen oder Teilen davon sind bisher fast ausschließlich mit Biotestmethoden durchgeführt worden (vgl. BRIGGS, 1973). Die Ergebnisse sind sehr widersprüchlich. So kamen die meisten Experimentatoren zu dem Schluß, daß GA_3 das mengenmäßig vorherrschende und physiologisch wirksame Gibberellin sei (z.B. COHEN und PALEG, 1967; GROAT und BRIGGS, 1969), während andere vorwiegend GA_1 fanden (z.B. RADLEY, 1967). Auch die Frage, ob die im Embryo produzierten Gibberelline mengenmäßig ausreichen, um in der Aleuronschicht α-Amylase induzieren zu können, ist nicht geklärt. Zu diesem Zweck vorgenommene Versuche mit isolierten Embryonen, deren Gibberellingehalt mit Hilfe von Biotests gemessen wurde, brachten gegensätzliche Ergebnisse zu Tage: YOMO und IINUMA (1966) fanden zur Induktion ausreichende Mengen von Gibberellin, RADLEY (1967) sowie COHEN und PALEG (1967) hingegen nicht.

Fütterungsexperimente mit radioaktiv markierten Vorstufen der Gibberellinbiosynthese erbrachten keinen Aufschluß darüber, ob die Biosynthese des in der Gerste physiologisch wirksamen Gibberellins hauptsächlich im Embryo stattfindet; auch fanden sich keine stichhaltigen Daten, die eine Diffusion von Gibberellinen in die Aleuronschicht zeigen konnten (s. BRIGGS, 1973). Ebenfalls widersprüchlich sind Ergebnisse quantitativer Bestimmungen von Gibberellinen in keimenden Karyopsen. Zwar fanden GROAT und BRIGGS (1969) eine erhöhte Gibberellinaktivität wenige Stunden vor dem Anstieg der α-Amylase, als sie aber in einigen Experimenten die Inkubationsbedingungen veränderten, lag das Maximum der Enzymaktivität zeitlich

vor dem Maximum der Gibberellinaktivität.

Diese Ausführungen sollen verdeutlichen, daß das oben geschilderte Modell der Induktion der α-Amylase durch Gibberelline nicht unumstritten ist, vor allem, was die Funktion der Gibberelline endogen betrifft. Die Schwierigkeiten bei der Aufklärung der Wirkungsweise von Phytohormonen sind zumindest teilweise mit unzureichenden Analysemethoden in Zusammenhang zu bringen. Dies soll am Beispiel der Gibberelline näher erläutert werden:

Eines der ältesten benutzten Meßverfahren ist der Biotest.Für die Gibberelline werden eine Reihe biologischer Systeme zur indirekten Quantifizierung und Aktivitätsbestimmung herangezogen (BAILISS und HILL, 1971).Im Zwergerbsentest wird das Wachstum von Zwergmutanten nach Zugabe von Gibberellinen gemessen (McCOMB und CARR,1958; KÖHLER und LANG,1963).Auch die beschriebene Induktion hydrolytischer Enzyme in Aleuronschichten keimender Getreidekaryopsen wird als Biotestverfahren ausgenutzt,indem die Steigerung von Enzymaktivitäten (JONES und VARNER,1967;BRIGGS,1967), die in der Aleuronschicht gebildeten Proteine (MAPELLI und RANIERI,1978) oder die im Korn freigesetzten Zucker (NICHOLLS und PALEG,1963; COOMBE et al.,1967) gemessen werden.Gibberellinbiotests sind relativ empfindlich,die Meßbereiche liegen für GA_3 zwischen 10^{-7} und 10^{-11} M (REEVE und CROZIER,1980).

Problematisch für die Exaktheit der Analysen ist die geringe Spezifität der meisten Biotests, weil das Vorkommen mehrerer Gibberelline in unterschiedlichen Mengenverhältnissen in einem Pflanzenextrakt und deren verschiedene biologische Aktivität eine Standardisierung sehr schwierig macht. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wird durch

die Uneinheitlichkeit des biologischen Materials erschwert, z.B. bei Benutzung von Karyopsen verschiedener Erntejahre im Gerstenendosperm-Biotest (JACKSON, 1971). Kritisch können sich auch Verunreinigungen zu messender Proben mit anderen biologisch aktiven Substanzgruppen wie Abscisinsäure (CHRISPEELS und VARNER, 1966) oder mit vielen Chemikalien (BRIGGS, 1966) auswirken. Diese Unwägbarkeiten zusammengenommen können zu starken Schwankungen der Meßwerte führen, wie z.B. REEVE und CROZIER (1980) in sorgfältigen Untersuchungen gezeigt haben. Man kann also sagen, daß der Biotest zwar geeignet ist, die biologische Aktivität von Gibberellinen zu bestimmen oder Erkenntnisse über Struktur-Aktivitätsbeziehungen zu gewinnen, daß er sich für exakte quantitative Bestimmungen aber schlecht eignet.

Der Einsatz chromatographischer Methoden stellt eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung von Gibberellinen dar. Oft werden sie kombiniert mit Biotests oder spektroskopischen Verfahren eingesetzt. Dünnschicht- und Papierchromatographie sind dabei mittlerweile von geringerer Bedeutung, weil die Trennleistung für die große Anzahl chemisch sehr ähnlicher Gibberelline unzureichend ist. Eine bessere Trennung liefert die Gaschromatographie, wobei die Gibberelline in flüchtige Derivate wie Ester oder Äther überführt werden und nach erfolgter Trennung aus diesen Verbindungen wieder freigesetzt werden (CAVELL et al.,1967 ; MacMILLAN und PRYCE,1973). Ein Problem bei der Gaschromatographie stellt die Gefahr der Kontamination von Extrakten mit Gibberellinen bei der Reinigung (BINKS et al., 197o; GASKIN et al., 1971; DENNIS et al., 198o; LEWAK und SINSKA, 198o) oder mit Substanzen ähnlicher Retetentionszeiten wie Phenole, Fettsäuren oder Zucker (GASKIN und MacMILLAN, 1978) dar. Die besten Trennergebnisse für Gibberelline werden mittlerweile mit der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC ; REEVE und CROZIER, 1978; TAKAHASHI et al.,

1982) erreicht. Für sich alleine genommen stellen diese chromatographischen Verfahren jedoch keine eindeutige Identifizierung dar, weil die Charakterisierung der Gibberelline nur anhand der Cochromatographie von Referenzen vorgenommen werden kann. Direkte Identifizierung ist z.B. mit der NMR-Spektroskopie (HANSON, 1965; YAMAGUCHI et al., 1975) oder der Massenspektroskopie (WULFSON et al., 1965; TAKAHASHI et al., 1967) möglich.

Ein relativ empfindliches Verfahren zur Bestimmung von Gibberellinen ist die Kombination von Gaschromatographie und Massenspektroskopie (GC-MS; MacMILLAN et al., 1967, 1972 ; BINKS et al., 1971). Die GC-MS-Technik ermöglicht den Nachweis von bis zu $1o^{-11}$ g einer Verbindung. Mit einer Variante dieser Methode, dem "Selected Ion Current Monitoring" (SICM) können $5 \times 1o^{-11}$ - $5 \times 1o^{-14}$ g Gibberellin nachgewiesen werden. GASKIN und MacMILLAN (1978) konnten mit Hilfe dieser Technik Substanzgemische untersuchen, die nur wenige Prozent der zu messenden Substanz enthielten. Dieser Reinheitsgrad ist in Pflanzenextrakten aber nur mit vielen Reinigungsschritten zu erreichen. Die dabei auftretenden Verluste sind nicht genau quantifizierbar, so daß auch dieses Meßverfahren keine exakten Bestimmungen ermöglicht. Die GC-MS-Technik erfordert einen großen apparativen Aufwand und ist daher nur für wenige Experimentatoren erschwinglich. Die oben genannte Nachweisempfindlichkeit konnte lediglich in zwei Labors auf der Welt (MacMillan in Bristol und Takahashi in Tokio) erreicht werden. Der enorme zeitliche Aufwand gerade dieser empfindlicheren Nachweisverfahren läßt sie für Routineuntersuchungen physiologischer Vorgänge außerdem ungeeignet erscheinen.

Ein Verfahren, das sich besonders in der klinischen Medizin als empfindliche und spezifische Nachweismethode durchgesetzt hat (STELLNER, 1977) ist der erstmals von BERSON und

YALOW 1959 angewendete Radioimmuntest (RIA). Die Effektivität der Methode beruht auf der Kombination der hohen Nachweisempfindlichkeit radioaktiver Substanzen mit der großen Spezifität der Antigen-Antikörper-Reaktion (ECKERT, 1976). Eine bekannte Menge radioaktiv markierten Antigens konkurriert im Test mit einer variablen Menge nichtmarkierten Antigens um Bindungsstellen einer konstanten Menge spezifischer Antikörper, was durch folgende Gleichgewichtsreaktion beschrieben werden kann:

$$Ag + Ag^x + Ak \rightleftharpoons Ag\text{-}Ak + Ag^x\text{-}Ak + Ag + Ag^x$$

Ag = unmarkiertes Antigen
Ag^x = markiertes Antigen
Ak = Antikörper
Ag-Ak, Ag^x-Ak = resultierende Antigen-Antikörperkomplexe

Anhand der Abnahme der Radioaktivität in der gebundenen Phase können mit Hilfe einer Standardkurve Proben unbekannter Konzentration quantifiziert werden.

Das gleiche Meßprinzip liegt auch dem Enzymimmuntest (ENGVALL und PERLMANN, 1971; van WEEMEN und SCHUURS, 1971) zugrunde. Das Antigen wird hier durch kovalente Bindung an ein Enzym hoher spezifischer Aktivität und Reinheit, wie z.B. alkalische Phosphatase oder Peroxidase, markiert. Die Messung des gebundenen Antigens erfolgt dann durch die Umsetzung spezifischer Substrate (s. dazu Abbildung 3). Dieses Verfahren bringt gegenüber dem Radioimmuntest in vielen Fällen einen Gewinn an Empfindlichkeit.

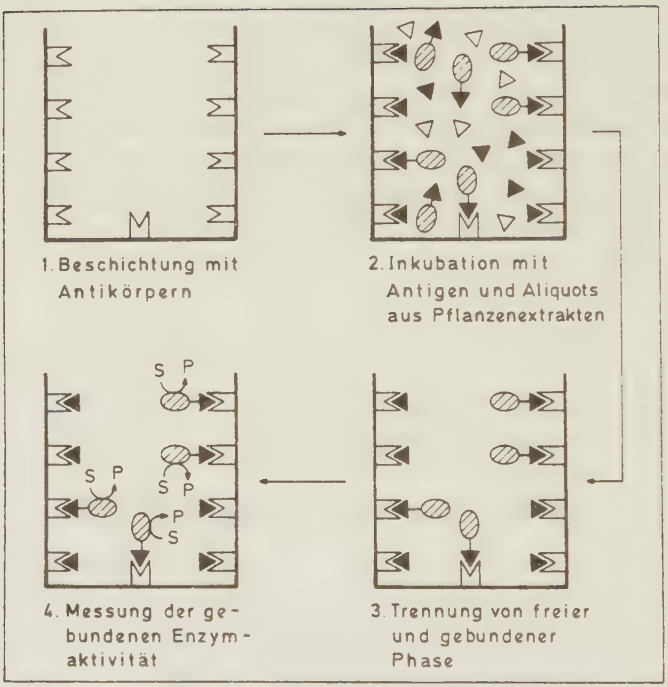


Abbildung 3 : Prinzip eines Festphasenenzymimmuntests zur Messung von Phytohormonen in Pflanzenextrakten. ⊓ = Immunglobulinfraktion spezifischer Antikörper, ⬭→ = enzymmarkiertes Antigen, ▲ = unmarkiertes Antigen, △ = sonstige, nicht immunreaktive Substanzen. S = Substrat, P = Produkt. Nach WEILER et al., 1981; verändert.

Radioimmuntests wurden bereits für Indolessigsäure (PENGELLY und MEINS, 1977; WEILER, 1981), Abscisinsäure (WEILER, 1979), GA_3 (FUCHS und GERTMAN, 1974; WEILER und WIECZOREK, 1981), und Cytokinine (WEILER, 1980; WEILER und SPANIER, 1981) entwickelt. Enzymimmuntests gibt es für die Bestimmung von Indolessigsäure (WEILER et al., 1981) und Abscisinsäure (WEILER, 1982).

Für eine empfindliche und spezifische Messung von Gibberellinen ist bisher nur der Radioimmuntest von WEILER und WIECZOREK (1981) geeignet. Da er aber nur GA_3 und GA_7 präzise erfaßt, war es wünschenswert, auch Immuntests für andere physiologisch aktive Gibberelline zu entwickeln, insbesondere für GA_1, die in höheren Pflanzen als das wichtigste physiologisch aktive Gibberellin angesehen wird (vgl. GRAEBE und ROPERS, 1978).

Die ^{125}Jod-Markierung des GA_3-Antigens in dem oben erwähnten RIA erfordert mehrere verlustreiche Syntheseschritte, so daß für den Aufbau eines RIA mehr als 1o mg Gibberellin zur Verfügung stehen müssen. Da aber die meisten Gibberelline nur in äußerst geringen Mengen verfügbar sind (z.T. weniger als 1 mg), eignet sich diese Art der Markierung nicht für andere Gibberelline, zumal wegen der kurzen Halbwertszeit des ^{125}J das Antigen alle zwei Monate neu markiert werden müßte.

Wie schon angedeutet, herrscht über die Natur des endogen wirksamen Gibberellins bei der Induktion der α-Amylase noch keine Klarheit. Nahezu alle vorliegenden Daten für die Hormone stammen aus Messungen mit Biotests, so daß eine spezifischere und empfindlichere Methode wie der Radio- oder Enzymimmuntest neue Erkenntnisse über die physiologisch wirksamen Gibberelline bei der Induktion hydrolytischer Enzyme zu Tag fördern könnte.

Neben den Gibberellinen wird auch den anderen Phytohormonen eine Funktion bei der Keimung oder den sie begleitenden Prozessen in Getreidekaryopsen zugeschrieben (vgl. KHAN und TAO, 1978). Insbesondere Abscisinsäure (ABA) soll eine hemmende Wirkung auf die Keimung (KHAN und DOWNING; 1968) und auf die α-Amylaseformation in der Gerste (CHRISPEELS und VARNER, 1967b) ausüben. Mit Hilfe der zur Verfügung stehenden Immuntests für ABA und andere Phytohormone könnte dies näher untersucht werden.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, zunächst die erforderlichen immunologischen Bestimmungsverfahren für möglichst viele physiologisch aktive Gibberelline bzw. deren Vorstufen zu entwickeln. Mit Hilfe dieser Immuntests sollten insbesondere neue Erkenntnisse über die Funktion von Gibberellinen bei der Induktion der α-Amylase in keimenden Gerstenkaryopsen gewonnen werden. Darüber hinaus war mit den bereits zur Verfügung stehenden Radio- und Enzymimmuntests für die anderen Phytohormone zu klären, inwieweit diese eine Rolle bei der Induktion des Enzyms spielen. Eine weitere Aufgabe war es, den Einfluß von Phytohormonen, besonders der ABA, auf die Keimung von Gerstenkaryopsen näher zu untersuchen.

II. Material und Methoden

1. Chemikalien und Geräte

1.1. Chemikalien

GA_3 und $GA_{4/7}$ (Gemisch aus 7o % GA_4 und 3o % GA_7) wurden von Serva, Heidelberg, bezogen. GA_1, GA_4, GA_7, GA_9, GA_{13}, iso-GA_3 und iso-GA_7 stammten von Imperial Chemical Industries Limited, Großbritannien, Steviol und Helminthosporsäure von Prof. Dr. B.G. Coombe, Adelaide. GA_8-Glucosid und Gibberethion wurden von Dr. T. Yokota, Tokio, zur Verfügung gestellt. Gibberinsäure, epi-Gibberinsäure, allo-Gibberinsäure und epiallo-Gibberinsäure sowie eine HPLC-gereinigte GA_3 (Reinheitsgrad ca. 95 %) wurden von Prof. Dr. J. MacMillan, Bristol, überlassen. Alle übrigen Gibberelline stammten von Prof. Dr. N. Takahashi, Tokio.

Für die freundliche Überlassung der zum großen Teil nur in äußerst geringen Mengen verfügbaren Gibberelline und Derivate sei allen Erwähnten, besonders aber Prof. Dr. MacMillan und Prof. Dr. Takahashi, recht herzlich gedankt.

Freund's komplettes Adjuvant stammte von Difco, Detroit, Rinderserumalbumin(RSA) von Serva, Heidelberg.

Folgende Reagentien wurden bei der Durchführung der Radioimmuntests eingesetzt: Rinderserum von Mediapharm, Aschaffenburg; phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (0.01 M Phosphat, 0.15 M NaCl, pH 7.4) mit folgender Zusammensetzung: 1.824 g K_2HPO_4 x 2 H_2O, 0.276 g NaH_2PO_4 x H_2O und 8.77 g NaCl in 1000 ml H_2O; Szintillator Minisolve-1 (Koch-Light), bezogen von Zinsser, Frankfurt/Main.

Für die Enzymimmuntests wurden folgende Reagentien benutzt: Alkalische Phosphatase (spezifische Aktivität > 2000 U/mg Protein) von Boehringer, Mannheim; TRIS-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (0.15 M NaCl, 0.05 M Tris-hydroxymethyl-aminomethan, mit 1 M HCl eingestellt auf pH 7.8); p-Nitrophenylphosphat (Sigma 104) von Sigma,München;"Goat Antibody to Rabbit γ-Globulin" (125 Units,gefriergetrocknet) von Calbiochem-Behring, USA.

ß-Glucosidase (Emulsin) wurde von Roth, Karlsruhe, bezogen, Macerase und Cellulysin von Calbiochem, USA. Pronase E stammte von Merck, Darmstadt.

Die Inhibitoren CCC, AMO 1618 und Phosfon D wurden von Sigma, München, geliefert; Ancymidol wurde von Dr. E. Weiler zur Verfügung gestellt.

Alle übrigen Chemikalien waren von größtmöglicher Reinheit.

1.2. Radiochemikalien

Tritiummarkiertes Natriumborhydrid (NaB^3H_4) mit einer spezifischen Aktivität von 6o Ci/mMol stammte von NEN, Dreieich, ebenso die Gibberelline [1,2-^{3}H]-GA_1 (spezifische Aktivität: 38 Ci/mMol) und [1,2-^{3}H]-GA_4 (spezifische Aktivität: 37 Ci/mMol).

[^{3}H](±)-ABA (spezifische Aktivität: 33 Ci/mMol) wurde von Amersham, Braunschweig, bezogen.

1.3. Geräteliste

Cryofuge 6-6	Heraeus Christ
Szintillationszähler BF 5001 mit angeschlossener Teletype	Berthold
Enzymimmunoassay-Spektro-photometer PR 5o	Gilford
Kleincomputer HP 9815A mit Drucker HP 9871 A und Lochstreifenleser HP 9883 A	Hewlett-Packard
BASIS 1o8 Microcomputer mit Epson Drucker	Isomess
Dünnschichtscanner Typ LB 283	Isomess
Spektralphotometer PMQ 6	Zeiss
Registrierendes Spektral-photometer (Modell Nr. 24) mit angeschlossenem Schreiber	Beckmann

2. Synthesen

2.1. Kopplung von Gibberellinen an Proteine

Die Anhydride der Gibberelline GA_3, GA_4 und $GA_{4/7}$ wurden nach MacMILLAN und MOFFAT (1962) hergestellt. Die Kopplung der Anhydride an Rinderserumalbumin (RSA), p-Aminohippursäure-RSA und alkalische Phosphatase (AP) ist in den Kapiteln III.1.1.und III.1.3.beschrieben. p-Aminohippursäure-RSA mit einer Substitutionsrate von 15 Molekülen p-Aminohippursäure pro Molekül Protein wurde nach WEILER (198o) synthetisiert.

2.2. Derivatisierung von Gibberellinen

Die Synthese der GA_3- und GA_9-17-Norketone erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift von CROSS et al. (1964) und ist zusammen mit der Reduktion der Norketone ausführlich in Kapitel III.1.2. dargestellt.

3. Immunisierung und Gewinnung von Antikörpern

Zur Gewinnung der Antiseren dienten Kaninchen, die im Institut gehalten wurden. Da die Antikörperbildung in hohem Maße vom Genotyp des betreffenden Tieres abhängig sein kann (ODELL et al., 1972), wurden stets Mischrassen verwendet, um die Chance zu vergrößern, daß geeignete Antiseren produziert würden.

Die Immunisierung erfolgte nach der im Institut angewendeten Methode (WEILER und ZENK, 1976; ARENS, 1976): Die Konjugate waren in PBS pH 7.4 gelöst (2mg/ml) und wurden mit dem gleichen Volumen Freund'schen Adjuvant versetzt und durch Ultraschallbehandlung emulgiert. Den Tieren wurde viermal im Abstand von einer Woche je 0.5 mg Konjugat in die Rückenhaut injiziert (Vorimmunisierung), danach erfolgte alle vier Wochen eine Injektion von 1 mg Konjugat in die Muskulatur des rechten Hinterlaufes ("Boost").

2o-4o ml Blut wurden den Kaninchen sieben und 14 Tage nach jeder Boosterinjektion aus der rechten Ohrvene entnommen. Nach Absonderung des Blutkuchens vom Serum konnte dieses ohne weitere Reinigung im Radioimmuntest eingesetzt werden.

Zur Durchführung der Festphasen-Enzymimmuntests war eine Isolierung der Immunglobulinfraktion (IgG) aus den Antiseren notwendig. Sie erfolgte nach der von HURN und CHANTLER (198o) angegebenen Rivanol-/Ammoniumsulfat-Präzipitationsmethode:

5 ml Antiserum wurden mit0.1 M NaOH auf pH 8.5 eingestellt und unter leichtem Rühren mit 17.5 ml einer wäßrigen Lösung von 0.4 % (w,v) 6.9-Diamino-2-ethoxy-acridyl-lactat (Rivanol) versetzt. Nach Dekantieren und Zentrifugation

des Überstandes wurde die gelbe Lösung mit 1 - 1.5 g aktivierter Holzkohle (Sigma C-5510) zehn Minuten gerührt. Aus der nach wiederholtem Filtrieren klaren Lösung wurden die Immunglobuline mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung ausgefällt. Nach 16 Stunden Stehen bei 4°C wurde zentrifugiert, das Pellet in 5 ml PBS pH 7.4 aufgenommen und drei Tage gegen je 5 Liter PBS bei 4°C dialysiert. Das gefriergetrocknete IgG wurde bei -18°C bis zur Beschichtung der Testplatten aufbewahrt.

4. Durchführung der Immuntests

4.1. Radioimmuntests

Die radioimmunologische Messung von freier Abscisinsäure (ABA) und ihrer C_1-gebundenen Konjugate wurde nach WEILER (1979), die der Cytokinine trans-Zeatin und Isopentenyladenosin (IPA) nach WEILER (198o) bzw. WEILER und SPANIER (1981) durchgeführt.

Die Durchführung der entwickelten Radioimmuntests für GA_1, GA_3 und GA_9 folgte dem in Tabelle 1 gezeigten Schema. Es wurden stets Triplettbestimmungen durchgeführt. Für jede Probe wurde eine Gesamtradioaktivität von 7000 cpm (= 58300 dpm bei einer Zählausbeute von 12 %) eingesetzt; dies entsprach ca. 0.5 - 1.5 pMol an markiertem Gibberellinantigen (vgl. Kapitel III.2.3.). Der Antiserumtiter wurde auf 3o - 35 % Bindung des markierten Antigens in Abwesenheit von unmarkiertem Antigen eingestellt. Drei Probentypen sind zur Durchführung der Tests notwendig: Die Proben zur Ermittlung der unspezifischen Bindung (UB), solche zur Bestimmung der maximalen Radioaktivität, die in Abwesenheit von unmarkiertem Antigen gebunden wird (B_o), und schließlich solche zur Feststellung des Verhältnisses von gebundenem und nicht gebundenem Antigen im Test (B).

Vor der Anwendung der Radioimmuntests mußten die optimale Antikörperkonzentration, Art und pH des Puffers der Reaktionslösung, die günstigsten Inkubationsbedingungen sowie die effektivste Ammoniumsulfatsättigung ermittelt werden (vgl. Kapitel III.2.1.).

Tabelle 1: Ablauf der Gibberellin-Radioimmuntests

Probentyp	UB	B_o	B
Puffer (ml)	0.5	0.5	0.5
Rinderserum (ml)	0.1	0.1	0.1
Markiertes Antigen (ml)	0.1	0.1	0.1
Unmarkiertes Antigen (ml)	-	-	0.1
Antiserum (ml)	-	0.1	0.1
H_2O (ml)	0.2	0.1	-
Inkubation: 2 Stunden bei Raumtemperatur			
Fällung: 1.2 ml 90.8 % gesättigtes $(NH_4)_2SO_4$ Inkubation: 30 Minuten bei Raumtemperatur Zentrifugation: 10 Minuten bei 3500 u min^{-1}			
Waschen der Pellets mit 1 ml 52 % gesättigtem $(NH_4)_2SO_4$ Zentrifugation: 10 Minuten bei 3500 u min^{-1}			
Resuspension der Pellets in 0.25 ml H_2O Zugabe von 1 ml Szintillator, Mischen, 2 - 4 Minuten Zählzeit je Probe im β-Counter			

4.2. Enzymimmuntests

Die Immunreaktivität der enzymmarkierten Gibberelline mit den entsprechenden Antiseren wurde mit Hilfe der sogenannten Doppel-Antikörpermethode (vgl. MIDGLEY und HEPBURN, 1980) bestimmt. Zur Messung von Gibberellinen in Pflanzenextrakten wurden dann Festphasen-Enzymimmuntests für GA_3 und GA_4 entwickelt. Eine Erläuterung des Prinzips und der Durchführung beider Testmethoden wird in Kapitel III.3.1., wo die Optimierung der Bedingungen für die Enzymimmuntests beschrieben ist, gegeben.

4.3. Berechnung immunologischer Ergebnisse

Die Meßwerte bei den Radioimmuntests lagen in cpm vor und wurden,falls notwendig,nach erfolgter interner Standardisierung in dpm umgerechnet.Die Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase erfolgte durch Messung der Extinktion des gebildeten p-Nitrophenolats (ε_{405} = 18.5 x 10^6 cm^2/Mol) im Photometer bei 405 nm. Die Mittelwerte der stets durchgeführten Dreifachbestimmungen in Radio- bzw. Enzymimmuntests wurden jeweils um die unspezifische Bindung korrigiert.

Zum Aufstellen von Standardkurven ist die Berechnung der relativen prozentualen Bindung B/B_o notwendig (s. COOK, 1975). Sie ist der Quotient der Meßwerte von Proben mit bzw. ohne unmarkiertem Antigen:

$$B/B_o(\%) = 100 \times \left(\frac{B_x - UB}{B_o - UB}\right)$$

B_x: Proben mit unmarkiertem Antigen

Eine Möglichkeit zur Darstellung von Standardkurven in linearer Form bietet die logit-log-Transformation (RODBARD, 1974). Auf der Abszisse werden die Mengen unmarkierten Antigens im logarithmischen Maßstab aufgetragen, auf der Ordinate der logit B/B_o. Dieser Wert berechnet sich nach folgender Gleichung:

$$\text{logit } B/B_o(\%) = \ln \left(\frac{B/B_o(\%)}{100 - B/B_o(\%)}\right)$$

Die logit-log-Auftragung wurde bei der Darstellung der charakteristischen Parameter der Immuntests (Kapitel III.2.3. und III.3.3.) und bei der Überprüfung der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit (Kapitel III.4.2.) gewählt. Bei der Auswertung der Meßergebnisse mit Hilfe von Computern wurden die Standardkurven in der sigmoiden B/B_o-Form dargestellt. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Computerprogramme verwendet. Im Programm des HP 9815 A diente die "spline"-Näherungsmethode (MARSCHNER et al., 1974) als Grundlage für die Auftragung der Standardkurve. Beim BASIS 108 Microcomputer erfolgte die Datenauswertung nach einem Programm der Firma Isomess,geschrieben von R.GRUGEL, Nuclear Interface,basierend auf polynomer Regression (2.-5. Ordnung) als Näherungsmethode für die Standardkurve.Der größte Teil der RIA-Daten war auf Lochstreifen gespeichert und wurde mit Hilfe des Lochstreifenlesers HP 9883 A in die Rechner eingegeben.

5. Herkunft und Behandlung des Pflanzenmaterials

5.1. Liste der verwendeten Gerstensorten

Hordeum vulgare L. cv. Himalaya	a) Freilandanbau im Botanischen Garten der Ruhruniversität Bochum, nicht kontrolliert bestäubt; Erntejahre: 1978 und 1982; ursprüngliche Herkunft des Saatguts: Pullman, USA (Ernte 1973). b) von Washington State University, Pullman, USA; Erntejahr 1980 c) von Dr. J. Lenton, Rothamsted Experimental Station, Großbritannien; Erntejahre: 1978, 1981, 1982
Hordeum vulgare L. cv. Clipper	von Prof. Dr. P.B. Nicholls, Adelaide, Australien; 2 Sorten "response-type on", 1 Sorte "response-type off" (s. Kapitel III.5.1.2.3.). Erntejahr: jeweils 1980
Hordeum vulgare L. var. Nordal	von Prof. Dr. C. Gibbons, Carlsberg Research Laboratory, Dänemark; Erntejahr: 1981.
Hordeum distichon L. var. Proctor	von der National Seed Development Organization, Cambridge, Großbritannien; Erntejahr: 1978.

5.2. Behandlung der Gersten

5.2.1. Sterilisation und Keimung von Gerstenkaryopsen

Gerstenkaryopsen wurden, falls erforderlich, manuell entspelzt, nach CHRISPEELS und VARNER (1967) bzw. BRIGGS (1967) mit Jod/Kaliumjodidlösung auf Intaktheit der Aleuronschichten überprüft und mit Natriumhypochlorid oberflächensterilisiert. Anschließend wurden sie unter sterilen Bedingungen in mit feuchtem Filterpapier ausgelegte Glaspetrischalen von 9 cm Durchmesser gegeben. Das Filterpapier war mit je 3 ml sterilem Wasser angefeuchtet, das 2.5 µg/ml Streptomycin und 3o µg/ml Penicillin enthielt. Unter diesen Bedingungen war auch nach acht Tagen kein Wachstum von Mikroorganismen festzustellen (s. dazu Kapitel III.5.1.1.).3o - 5o Karyopsen pro Petrischale inkubierten bis zu sieben Tage lang bei 14.4°C im Dunkeln.

5.2.2. Inkubation von embryofreien Karyopsen und Embryonen

Karyopsen wurden wie in 5.2.1. beschrieben behandelt und nach Oberflächensterilisation zwei Stunden in sterilem Wasser gequollen. Danach wurden die Embryonen einschließlich des Scutellums abgelöst. Entweder zehn vom Embryo befreite Präparate oder 2o Embryonen wurden in 1 ml 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.0, ebenfalls mit 2.5 µg Streptomycin und 3o µg Penicillin, bei 14.4°C unterschiedlich

lange Zeiten inkubiert. Falls notwendig wurden den Inkubationsmedien Gibberelline, Abscisinsäure bzw. Hemmstoffe der Terpenoid- und Gibberellinbiosynthese zugesetzt (s. Kapitel III5.1.4). Alle Schritte liefen unter sterilen Bedingungen ab.

5.2.3. Inkubation isolierter Aleuronschichten

Aleuronschichten wurden nach einer Vorschrift von CHRISPEELS und VARNER (1967a) präpariert: Entspelzte und oberflächensterilisierte Karyopsen wurden von Embryonen (einschließlich Scutellum) getrennt und auf feuchten Seesand aufgesetzt. Nach zwei Tagen Inkubation im Dunkeln bei 25°C wurde das Stärkeendosperm so gut wie möglich von den Aleuronschichten getrennt und die Aleuronschichten von je 2o Karyopsen entweder bei 14.4°C oder bei 25°C in 1 mM Natrium-Acetat-Puffer pH 4.8 mit 100 mM $CaCl_2$ inkubiert. Das Inkubationsmedium enthielt Antibiotika gleicher Zusammensetzung und Konzentration wie in 5.2.1. und 5.2.2. beschrieben. Alle Schritte liefen unter sterilen Bedingungen ab.

5.3. Aufarbeitung des Pflanzenmaterials

5.3.1. Extraktion der Phytohormone

Gekeimte Karyopsen bzw. inkubierte Karyopsenteile oder Aleuronschichten wurden mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei -18°C aufbewahrt. Das tiefgefrorene Pflanzenmaterial wurde nach nochmaliger Behandlung mit flüssigem Stickstoff mechanisch zerkleinert und dreimal mit 80 % Methanol jeweils eine Stunde bei 4°C auf dem Überkopfschüttler extrahiert. Pro Extraktionsschritt

wurden 5 ml 8o % Methanol eingesetzt, das 10 mg/l 2,6-Di-tert-butylmethylphenol (BHT) enthielt. Dies sollte Oxidationsreaktionen von IES und ABA in den Extrakten verhindern (s. MILBORROW,1974). Nach jeder Extraktion wurde zentrifugiert (2500 u min^{-1}), die Überstände vereinigt und an einer Abdampfanlage mit thermoreguliertem Wasserbad (T=3o°) im Luftstrom bis auf die wäßrigen Rückstände eingeengt.

Zwecks Messung der Cytokinine und der freien und gebundenen ABA wurden den wäßrigen Rückständen Aliquots entnommen, nach Eindampfen in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 aufgenommen und im RIA eingesetzt.

Zur Bestimmung von IES und Gibberellinen wurde nach Ansäuerung der wäßrigen Rückstände mit 1 M HCl dreimal mit je 5 ml Äthylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden eingedampft, in Methanol aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -18°C aufbewahrt.

Die immunologische Messung von IES und Gibberellinen erforderte eine Methylierung der ausgeschüttelten Extrakte (s. WEILER und WIECZOREK, 1981, WEILER 1981) vor Einsatz in den Tests.

5.3.2. Dünnschichtchromatographische Trennung von Gibberellinen

Die unterschiedliche Spezifität der Antiseren der benutzten Gibberellin-Immuntests (s. Kapitel III.4.1. bzw. III. 5.1.) machte für einen Großteil der Analysen eine vorherige chromatographische Trennung der Gibberelline in den ausgeschüttelten Extrakten notwendig. Es wurden Dünnschicht-

platten der Firma Macherey-Nagel, Düren, verwendet (2o cm^2; 0.25 mm Kieselgelschicht mit Fluoreszenzindikator UV_{254}). Als Laufmittel diente Chloroform - Äthylacetat - Eisessig (7o + 3o + 5; v,v,v).

Ausreichende Mengen von Extrakten wurden in 2 cm breiten Banden mit geeigneten Referenzen auf die Platten aufgetragen. Zur Vermeidung von Kontaminationen der zu analysierenden Proben mit den Gibberellinreferenzen wurde längs der Laufrichtung zwischen Extrakt- und Referenzbanden die Kieselgelschicht ca. 2 mm breit entfernt. Die Laufstrecke betrug 15 cm. Als Referenzen dienten stets GA_1, GA_3, $GA_{4/7}$ und GA_9, sowie bei Bedarf weitere Gibberelline. Die R_f-Werte im benutzten Laufmittel sind in Tabelle 2 angegeben. Zur Bestimmung der Wiederfinderaten enthielten die Extrakte in einigen Experimenten 0.025 µCi $[^3H]$-GA_1 bzw. $[^3H]$-GA_4. Die Identifizierung der Referenzen erfolgte nach Besprühen mit methanolischer Schwefelsäure (5 %; v,v) und fünf Minuten Aktivierung bei 12o°C im Trockenschrank unter der UV-Lampe (blaugrüne Fluoreszenzen).

Die Extrakte wurden nach chromatographischer Auftrennung in 5 mm breiten Fraktionen mit 2 ml Methanol eluiert, methyliert, nach Eindampfen der organischen Lösungsmittel in 1 ml 0.1 M Kaliumphoshatpuffer pH 7.0 aufgenommen und die Fraktionen mit Hilfe der Gibberellin-Immuntests analysiert. Der Einfachheit halber, und weil auf diese Weise die Präzision der Analysen nicht vermindert wurde, wurden im größten Teil der Experimente Elution, Methylierung und Test nur der Fraktionen durchgeführt, die mit den Referenzen cochromatographierten.

Tabelle 2 : R_f-Werte chromatographierter Gibberelline

Gibberellin	R_f-Wert
GA_1	0.17
GA_3	0.15
GA_4	0.47
GA_7	0.54
GA_9	0.93
GA_5	0.51
GA_8	0.09
GA_{20}	0.50

5.3.3. Hydrolyse von Gibberellinkonjugaten

Je 40 unterschiedlich lange gekeimte Karyopsen bzw. trockene Körner wurden wie in 5.3.1. beschrieben aufgearbeitet.Die wäßrigen Rückstände der mit Äthylacetat ausgeschüttelten Extrakte wurden nach Neutralisation mit 1 M NaOH verschiedenen enzymatischen Reaktionen unterworfen;das gleiche geschah mit den Zentrifugaten:

Pronase E (70 000 PUK/g) reagierte in 5 ml wäßriger Lösung pH 7.0 vier Stunden bei 25°C auf dem Überkopfschüttler.Die löslichen Fraktionen des extrahierten pflanzlichen Materials enthielten 0.5 mg ,die nichtlöslichen 2 mg des Enzyms.Die Messung der Abnahme des Proteins durch Hydrolyse erfolgte mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assay Kit,Bio-Rad,München.Nach vier Stunden waren 80% des Proteins in den Ansätzen hydrolysiert.

Nichtlösliche Fraktionen wurden außerdem in 0.5 ml 0.2 M 2(N-Morpholino)-äthansulfonsäure-Puffer (MES) pH 5.5 suspendiert und mit 1 mg Macerase und 1 mg Cellulysin versetzt.Die Ansätze wurden bei 25°C 24 Stunden inkubiert (Überkopfschüttler).Nach dieser Zeit waren ca. 80% des Pflanzenmaterials enzymatisch

aufgeschlossen.Die Effektivität der Enzymreaktionen wurde anhand der Zunahme reduzierender Zucker in den Ansätzen (Hexokinase- , Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Reaktion;Test-Kit von Boehringer,Mannheim) überprüft. Nach 24 Stunden Reaktion waren zwischen 126 und 173 µg Glucose gebildet worden.

Alle Fraktionen,jeweils in 5 ml wäßriger Lösung,eingestellt auf pH 5.5,aufgenommen,wurden mit ß-Glucosidase (Emulsin,300 U/g) und "Helianthus-Esterase" behandelt. Letztere wurde aus 1 g Helianthus annuus L."Goldener Neger" nach der Methode von LEHMANN et al.(1975) isoliert. Zu den löslichen Fraktionen der Extrakte kamen 0.5 mg ß-Glucosidase und ein Drittel der aus 1 g Pflanzenmaterial isolierten Esterasesuspension,zu den unlöslichen Fraktionen 1 mg ß-Glucosidase und zwei Drittel der Esterasesuspension.Die Reaktionen dauerten 24 Stunden (25°C,Überkopfschüttler).Zur Überprüfung der Effektivität der Konjugatspaltung wurden unmittelbar nach Enzymzugabe 0.2 ml von jedem Ansatz entnommen und 100 µg Amygdalin und 50 µg ABA-ß-D-Glucopyranosylester zugegeben. Der Anteil der nicht umgesetzten Substanzen und ihrer Spaltprodukte Benzoesäure und ABA wurde nach 24 Stunden bestimmt.Dazu wurden definierte Mengen der Ansätze chromatographiert (Laufmittel: Chloroform - Methanol -Wasser; 70+10+3;v,v,v ;R_f-Werte: Amygdalin 0.26,Benzoesäure 0.72,ABA-ß-D-Glucopyranosylester 0.21,ABA 0.64).Nach 24 Stunden waren 100% Amygdalin und 95 - 100% ABA-ß-D-Glucopyranosylester gespalten.

Nach jeder der beschriebenen Enzymbehandlungen wurden die Ansätze mit 1 M HCl auf pH 2.5 eingestellt und dreimal mit 5 ml Äthylacetat ausgeschüttelt.Zur Gibberellinanalyse wurden die organischen Phasen wie in 5.3.1. beschrieben behandelt.

5.3.4. Bestimmung der Aktivität der α-Amylase

Die Extraktion des Enzyms erfolgte in abgewandelter Form nach der Methode von BRIGGS (1967): Tiefgefrorene Gerstenkaryopsen und -präparate wurden mechanisch zerkleinert und in 0.2 % Calciumacetat pH 6.0 (1 ml pro Präparat) 20 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach Zentrifugation (zehn Minuten bei 2300 u min^{-1}) wurde mit nach Maßgabe verdünnten Proben des Überstandes die Bestimmung der α-Amylaseaktivität nach CHRISPEELS und VARNER (1967a) durchgeführt. Die Enzymaktivität in isolierten Aleuronschichten wurde im Inkubationsmedium bestimmt. Dazu wurden Proben entnommen, in Calciumacetatpuffer bei 70°C inkubiert und anschließend die Aktivität der α-Amylase bestimmt.

6. Applikation von Abscisinsäure

6.1. Versuche zur Keimungshemmung

Gerstenkaryopsen bzw. Embryonen wurden in 100ml -Erlenmeyerkolben in 0.1 M Phosphatpuffer pH 5.5 (je 100 Karyopsen in 50 ml) mit ABA unterschiedlicher Konzentration (Kapitel III.5.2.1.) 24 Stunden bei 25°C im Dunkeln im Wasserbadschüttler inkubiert.Nach Ende der Inkubation wurden die Keimraten durch Auszählen der Präparate bestimmt.

6.2. Fütterung radioaktiv markierter ABA

Gefüttert wurden [^{3}H](±)-ABA sowie [^{3}H](+)-ABA und [^{3}H](-)-ABA (beide Enantiomere wurden aus dem Racemat über Immunoaffinitätschromatographie nach MERTENS et al.,1982 getrennt). Die spezifische Aktivität der Verbindungen betrug 33 Ci/mMol.

Gerstenkaryopsen bzw. isolierte Embryonen wurden je 24 Stunden bei 25°C im Wasserbadschüttler im Dunkeln inkubiert (je 10 Präparate in 2o ml 0.1 M Phosphatpuffer pH 5.5; 50 ml-Erlenmeyerkolben).Pro Ansatz wurden entweder [^{3}H](±)-ABA, [^{3}H](+)-ABA (je 0.25 µCi) oder [^{3}H](-)-ABA (0.1µCi) zugegeben.

Nach 24 Stunden wurden die Lösungen am Rotationsverdampfer eingedampft und in Methanol aufgenommen,Die Präparate wurden wie in 5.3.1. beschrieben aufgearbeitet und extrahiert, die Überstände nach Zentrifugation am Rotationsverdampfer eingedampft und ebenfalls in Methanol aufgenommen.Beide methanolischen Lösungen wurden vereinigt,auf je 1 ml eingeengt und definierte Mengen davon chromatographiert (Laufmittel: Toluol-Äthylacetat-Eisessig,70+30+5;v,v,v;

R_f-Werte der Referenzen: cis-trans-ABA 0.58,trans-trans-ABA 0.61,Phaseinsäure 0.42,ABA-ß-D-glucopyranosylester 0.05).

Nach Entwickeln der Chromatogramme wurden die Banden in je 5 mm breite Fraktionen unterteilt,mit je 2 ml Methanol eluiert,mit Stickstoff eingedampft und in 0.5 ml Methanol aufgenommen.Definierte Volumina wurden im Szintillationszähler je 10 Minuten gezählt (10 ml Szintillator) und die absoluten Zerfallsraten durch interne Standardisierung bestimmt.

III. Ergebnisse

1. Synthese von Gibberellin-Immunogenen und markierten Gibberellinderivaten

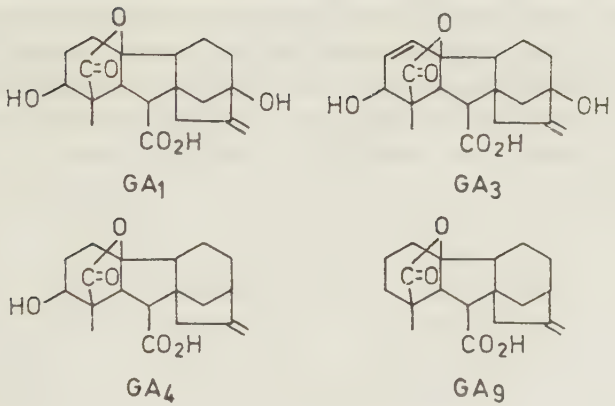


Abbildung 4: Struktur der Gibberelline, für die Immuntests entwickelt wurden.

Radio- und Enzymimmuntests sollten für die Gibberelline GA_1, GA_3, GA_4 und GA_9 (s. Abbildung 4) entwickelt werden. Dazu war es notwendig, markierte Antigene hoher spezifischer Aktivität zu synthetisieren und spezifische Antikörper zu induzieren.

Moleküle mit einer Masse von weniger als 1000 Dalton können nicht die Bildung von Antikörpern im Tier induzieren (vgl. HURN und LANDON, 1971). Daher mußten die Gibberel-

line bei einer Molekülmasse von ca. 350 Dalton an Makromoleküle, in diesem Falle Rinderserumalbumin, gekoppelt werden. Diese Hapten-Protein-Konjugate sollten in Kaninchen die Bildung spezifischer Antikörper bewirken.

Voraussetzung für eine gute Nachweisempfindlichkeit von Immuntests sind markierte Antigene hoher spezifischer Aktivität (vgl. CHARD, 1978). Neben radioaktiven Isotopen werden auch in zunehmendem Maße Enzyme zur Markierung eingesetzt (ENGVALL, 198o). Die Synthese von Enzymkonjugaten erfolgte durch Kopplung an alkalische Phosphatase, die der radioaktiven Gibberelline durch Tritiummarkierung.

1.1. Kopplung von Gibberellinen an Rinderserumalbumin

Um Haptene kovalent an Makromoleküle binden zu können, müssen geeignete funktionelle Gruppen vorhanden sein. Theoretisch sind dies alle funktionellen Gruppen im Bereich der organischen Chemie, welche miteinander verknüpfbar sind. Eine Übersicht über die gebräuchlichen Kopplungsmethoden in der Immunchemie geben z.B. ERLANGER (1973) oder KELLIE et al. (1975). Neben Humanserumalbumin wird Rinderserumalbumin (RSA) häufig für Kopplungszwecke benutzt (KABAT, 1971). Dieses Protein enthält zahlreiche Lysinmoleküle mit freien ε-Aminogruppen, welche die Knüpfung von Peptidbindungen mit den Carboxylgruppen von Haptenen ermöglichen (S. ERLANGER, 1980). Häufig angewendet dabei werden z.B. die Carbodiimidreaktion (SHEEHAN und HESS, 1955; KHORANA, 1955) oder die Reaktion über ein gemischtes Anhydrid (ERLANGER et al., 1957).

Da für alle Gibberelline das Vorhandensein einer COOH-Gruppe in C_7-Stellung am Ring B charakteristisch ist (vgl. GRAEBE und ROPERS, 1978), bietet sich eine Kopplung über diese Gruppe als generelle Methode zur Synthese von Gibberellinkonjugaten an. Strukturelle Unterschiede zwischen den bisher bekannten Gibberellinen bestehen vor allem im Substitutionsmuster von Ring A und Ring D (s. BEARDER, 1980). Funktionelle Gruppen eines Haptens können am besten als antigene Determinanten dienen, wenn sie möglichst weit von der Kopplungsstelle entfernt sind (CHARD, 1978). Dieser Aspekt ist bei der Synthese von Gibberellin-Protein-Konjugaten über die Carboxylgruppe berücksichtigt.

Die Kopplung von GA_3 über ein gemischtes Anhydrid an RSA wurde schon von WEILER und WIECZOREK (1981) erfolgreich durchgeführt. Neben diesem Konjugat lagen auch die von Dr. E. Weiler nach der gleichen Methode synthetisierten Proteinkonjugate von GA_1 und GA_9 vor. Eine andere Methode zur Synthese von Gibberellin-Immunogenen wurde erstmals in der vorliegenden Arbeit entwickelt: Nach der durch Dicyclo-

hexylcarbodiimid (DCC) katalysierten Reaktion von GA_3 bzw. $GA_{4/7}$ zu ihren Anhydriden (nach MacMillan und Suter, 1962) wurden diese an RSA gekoppelt. Abbildung 5 gibt eine Übersicht über die Synthese der Gibberellin-Protein-Konjugate am Beispiel von GA_3.

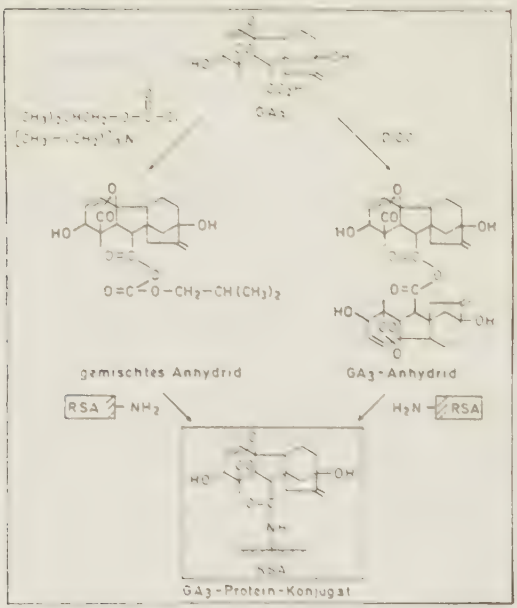


Abbildung 5: Synthese von Gibberellinsäure-Protein-Konjugaten. DCC = Dicyclohexylcarbodiimid; RSA = Rinderserumalbumin

GA_3-RSA-Konjugat wurde nach folgender Synthese hergestellt:

288 mg (0.83 mMol) GA_3 wurden bei Raumtemperatur 26 Stunden mit 85 mg (0.41 mMol) DCC in 4 ml wasserfreiem Dioxan gerührt. Der im Verlauf der Reaktion ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wurde abzentrifugiert und der Überstand in Aliquots von 5o µl schrittweise zu einer eiskalten Lösung von 200 mg (3.1 µMol) RSA in 5 ml H_2O und 5 ml Dimethylformamid (DMF) gegeben. Nach insgesamt drei Stunden Reaktion bei 0°C und 16 Stunden bei 4°C wurde der Ansatz drei Tage gegen 3 x 1o l dest. H_2O dialysiert, das Dialysat gefriergetrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -18°C aufbewahrt. Das Gewicht des Lyophilisates betrug 250 mg, was einer Ausbeute von ca. 90 % Protein entspricht.

Die Reaktion von $GA_{4/7}$-Anhydrid mit p-Aminohippursäure-RSA wurde folgendermaßen durchgeführt:

Die Anhydride der $GA_{4/7}$-Mixtur, erhalten durch die Umsetzung von 144 mg (0.43 mMol) $GA_{4/7}$ mit 42.5 mg (0.21 mMol) DCC in 2 ml wasserfreiem Dioxan, wurden in 50 µl-Mengen zu einer Lösung von 15o mg (2.2 µMol) p-Aminohippursäure-RSA in 2 ml H_2O und 2 ml DMF gegeben. Der Ansatz reagierte drei Stunden bei 0°C und 16 Stunden bei 4°C. Nach der Dialyse wurde das Konjugat gefriergetrocknet und bei -18°C aufbewahrt. Das Lyophilisat wog 130 mg; dies entspricht einer Ausbeute von ca. 9o % Protein.

Nach Ende der Dialyse wurde von jeder Konjugatlösung ein Aliquot entnommen und mit den Referenzen RSA und GA_3 bzw. $GA_{4/7}$ in dem in Kapitel II.5.3.2. angegebenen Laufmittel chromatographiert. Nach Besprühen mit methanolischer Schwefelsäure zeigten die Konjugatfraktionen keine für Gibberellin charakteristische Fluoreszenz auf der Höhe der entsprechenden Referenzen, was darauf hindeutete, daß die dialysierten Ansätze keine freien Gibberelline mehr enthielten. Die blaugrünen Fluoreszenzen der Konjugatfraktionen am Start, wo auch das RSA blieb, gaben Hinweis auf die erfolgte Kopplung der Gibberelline an RSA.

Von den gefriergetrockneten Konjugaten wurden die Kopplungsraten spektroskopisch bestimmt. Man geht dabei von der Annahme aus, daß sich das Konjugatspektrum annähernd additiv aus den Einzelspektren von RSA und dem betreffenden Gibberellin zusammensetzt. Die Spektren von RSA, GA_3, $GA_{4/7}$ und den Konjugaten, gelöst in konzentrierter Schwefelsäure, wurden im Bereich von 250 bis 500 nm aufgenommen. Im Maximum der Gibberellinabsorption wurden anhand dieser Spektren mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes die molaren Extinktionskoeffizienten (ε) aller Substanzen ermittelt. Die Kopplungsraten (K) der Konjugate errechneten sich nach folgender Gleichung:

$$K = \frac{\varepsilon_{Konjugat} - \varepsilon_{RSA}}{\varepsilon_{GA}}$$

Sie sind somit ein Maß für die Anzahl gekoppelter Moleküle Gibberellin pro Molekül RSA. Tabelle 3 gibt die Kopplungsraten der selbst synthetisierten GA_3- bzw. $GA_{4/7}$-Proteinkonjugate und der bereits verfügbaren RSA-Konjugate von GA_1, GA_3 und GA_9 an.

Tabelle 3: Kopplungsraten von Gibberellin-Protein-konjugaten und molare Extinktionskoeffizienten von Gibberellinen in den Absorptionsmaxima.

Konjugat	Kopplungsrate	molarer Extinktionskoeffizient (cm^2/Mol)
GA_1-RSA	3.5 : 1	GA_1: $\varepsilon_{385} = 2.0 \times 10^6$
GA_3-RSA (Anhydrid)	8.0 : 1	GA_3: $\varepsilon_{391} = 2.4 \times 10^6$
GA_3-RSA (gem. Anhydrid)	4.0 : 1	
$GA_{4/7}$-RSA	7.0 : 1	$GA_{4/7}$: $\varepsilon_{383} = 1.3 \times 10^6$
GA_9-RSA	3.6 : 1	GA_9: $\varepsilon_{381} = 2.6 \times 10^6$

1.2. Synthese radioaktiv markierter Gibberellinderivate

Mit Ausnahme von GA_3 waren Gibberelline in reiner Form nur in geringen Mengen (maximal 1o mg) verfügbar. Da die von WEILER und WIECZOREK (1981) beschriebene ^{125}Jod-Markierung der GA_3 wesentlich mehr als 1o mg Ausgangssubstanz erfordert und auch wegen der kurzen Halbwertszeit des Nuklids (6o Tage) ca. alle zwei Monate wiederholt werden muß, war diese Methode für die Markierung anderer Gibberelline nicht einsetzbar. Ein oft im Radioimmuntest verwendetes Nuklid ist Tritium. Zum Zeitpunkt der Entwicklung der Radioimmuntests war einzig [1,2-^{3}H]-GA_1 mit genügend hoher spezifischer Aktivität käuflich zu erwerben und wurde im GA_1-Radioimmuntest als markiertes Antigen eingesetzt. Die Synthese der radioaktiven Derivate von GA_3 und GA_9 wurde selbst durchgeführt.

Dabei stand die Überlegung im Vordergrund, daß die chemische Struktur von markiertem und unmarkiertem Antigen zur Vermeidung großer Affinitätsunterschiede zu den Antikörpern möglichst ähnlich sein sollte (STELLNER, 1977; CHARD, 1978). Die Synthese von radioaktiven Gibberellinen durch katalytische Hydrierung (z.B. nach KENDE, 1967; DURLEY und PHARIS, 1973; NADEAU und RAPPAPORT, 1974) war wegen der möglichen Freisetzung von Tritium in die Gasphase aus Sicherheitsgründen in dem verfügbaren Isotopenlabor nicht möglich. Deshalb mußte für die Markierung ein Weg eingeschlagen werden, der eine chemische Modifikation der Moleküle bewirkte. Es sollte jedoch vermieden werden, funktionelle Gruppen der Gibberelline, welche als antigene Determinanten dienen können, zu verändern, z.B. im A-Ring der Moleküle (s. Abbildung 4).

Fast allen Gibberellinen gemeinsam ist die exozyklische Doppelbindung zwischen C_{16} und C_{17} im D-Ring. Für einige Gibberelline ist die Oxidation an dieser Stelle zu einer Ketogruppe mit guten Ausbeuten beschrieben (z.B. CROSS et al. 1964).
Aldehyd- und Ketogruppen aber lassen sich gut mit Natriumborhydrid reduzieren, das tritiummarkiert mit hoher spezifischer Aktivität erhältlich ist. Durch eine solche Reduktion wurde die Markierung von GA_3 und GA_9 erreicht. Abbildung 6 zeigt am Beispiel von GA_9 die Synthese von GA_9-17-Norketon und die anschließende Reduktion mit $NaBH_4$ zum tritiummarkierten Derivat.

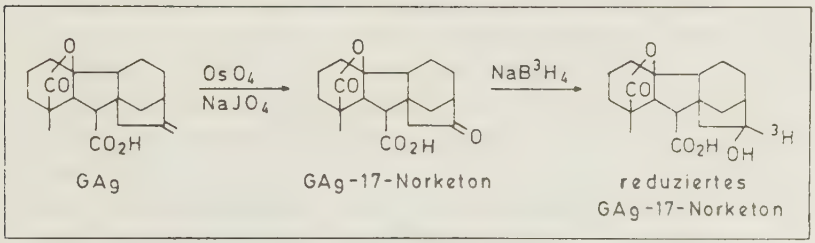


Abbildung 6: Radioaktive Markierung von GA_9-17-Norketon

1.2.1. Synthese von Gibberellin-17-Norketonen

Die Norketone von GA_3 und GA_9 wurden nach einer modifizierten Vorschrift von CROSS et al. (1964) synthetisiert. Dabei reagiert das Gibberellin mit Osmiumtetroxid und Natriumperjodat. Wahrscheinlich wird die exozyklische Doppelbindung zwischen C_{16} und C_{17} durch OsO_4 aufgespalten, wobei zwischenzeitlich an C_{16} eine Hydroxylgruppe und ein primärer Alkohol gebunden sind. Durch das starke Oxidationsmittel Natriumperjodat wird die Hydroxylgruppe unter Abspaltung des Alkohols zur Ketogruppe oxidiert. Die Reaktionen wurden folgendermaßen durchgeführt:

GA_9-17-Norketon:

20 mg (63,3 µMol) GA_9 wurden in 20 ml Tetrahydrofuran gelöst und mit 5 mg (19.7 µMol) Osmiumtetroxid (OsO_4) und 1oo mg (0.47 mMol) Natriumperjodat ($NaJO_4$) gelöst in 1o ml H_2O, 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Lösung auf die wäßrige Phase am Rotationsverdampfer eingeengt, mit 1o ml 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 3.0 versetzt und dreimal mit 2o ml Athylacetat ausgeschüttelt. Das GA_9-Norketon wurde aus der organischen Phase dünnschichtchromatographisch gereinigt mit einer Ausbeute von ca. 95 %. Als Laufmittel wurde Äthylacetat - Chloroform - Eisessig (60 + 40 + 5; v,v,v) verwendet. Der R_f-Wert für GA_9 betrug 0.85, der für das Norketon o.58.

GA_3-17-Norketon

20 mg (57.8 µMol) GA_3 in 2o ml Tetrahydrofuran reagierten mit 5 mg (19.7 µMol) OsO_4 und 100 mg (0.47 mMol) $NaJO_4$ in 10 ml H_2O. Nach Einengen auf die wäßrige Phase und Ansäuern auf pH 3.0 wurde mit Äthylacetat ausgeschüttelt. Die Reinigung des GA_3-Norketons erfolgte aus der organischen Phase durch Dünnschichtchromatographie; die Ausbeute betrug ca. 1o %.

Verwendetes Laufmittel: Äthylacetat - Eisessig (100 + 5; v,v); R_f-Werte: GA_3 0.67, GA_3-Norketon 0.23.

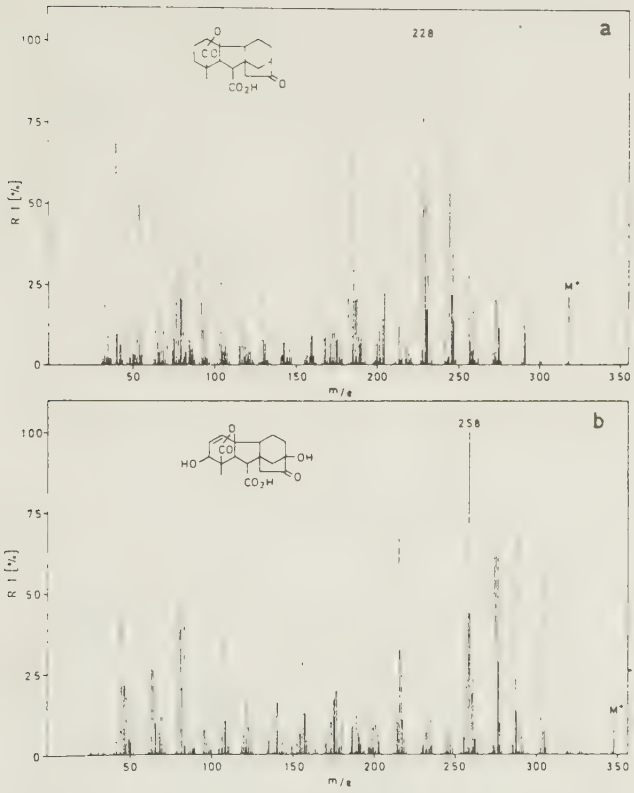


Abbildung 7: Massenspektren. a GA_9-17-Norketon, b GA_3-17-Norketon.
Ordinate: Relative Intensitäten (R.I.), Abszisse: Masseneinheiten (m/e).
M^+ = Molekülpeak.

Die Nachweise der gereinigten Reaktionsprodukte erfolgten durch Massenspektren (Abbildung 7). Die Molekülpeaks (M^+) lagen bei 318 für GA_9-17-Norketon und bei 348 für GA_3-17-Norketon, was den kalkulierten Molekülmassen entspricht. Bei beiden Produkten erreichte der Peak bei m-9o Masseneinheiten 100 % der relativen Intensitäten. Das Fragmentierungsmuster des GA_9-17-Norketons wies folgende Peaks auf, die mit dem von LIN und HEFTMANN (1979) veröffentlichten Massenspektrum übereinstimmten: M-28 (CO), M-44(CO_2), M-46(CO_2H_2), M-59(CO_2,CH_3), M-62(CO_2,H_2O), M-72(CO_2,CO), M-74(CO_2H_2,CO), M-9o(CO_2,CO_2H_2), M-133(CO_2,CO_2H_2,C_2H_3O). Das Fragmentierungsmuster des GA_3-17-Norketons weist die gleiche Peakfolge auf; eine Vergleichsmöglichkeit mit entsprechenden Literaturwerten existiert nicht.

1.2.2. Reduktion der Gibberellin-17-Norketone

In Vorversuchen wurden die Norketone von GA_3 und GA_9 nach folgender Methode reduziert:

> 1.74 mg (5 µMol) GA_3-17-Norketon oder 1.59 mg (5 µMol) GA_9-17-Norketon wurden mit 0.15 mg (4 µMol) $NaBH_4$ in 0.5 ml 50 % Äthanol reduziert. Nach zwei Tagen Reaktion bei -18°C wurden die Ansätze in den für die Norketone verwendeten Laufmitteln chromatographiert (R_f-Wert für 17-OH-GA_3: 0.12; für 17-OH-GA_9: 0.25). Die Ausbeuten betrugen in beiden Fällen ca. 4o %.

Für die Synthese radioaktiv markierter Gibberellin-Antigene wurden die Norketone im Hauptversuch mit tritiummarkiertem Natriumborhydrid (spezifische Aktivität: 6o Ci/mMol) unter gleichen Bedingungen umgesetzt:

> 0.87 mg (2.5 µMol) GA_3-17-Norketon bzw. 0.8 mg (2.5 µMol) GA_9-17-Norketon reagierten mit je 0.06 mg (1.6 µMol ≙ 96 mCi) $NaBT_4$ in 0.1 ml

5o % Äthanol zwei Tage bei -18°C. Die Ansätze wurden in den oben angegebenen Laufmitteln chromatographiert. Die Radioaktivitätsmessung der Dünnschichtplatten (Abbildung 8) ergab in beiden Fällen eine radioaktive Bande, deren R_f-Wert mit dem des entsprechenden 17-OH-Gibberellins aus dem Vorversuch übereinstimmte (Abbildung 6a und b). Die radioaktiven Banden wurden mit Methanol eluiert und in Methanol bei -18°C aufbewahrt.

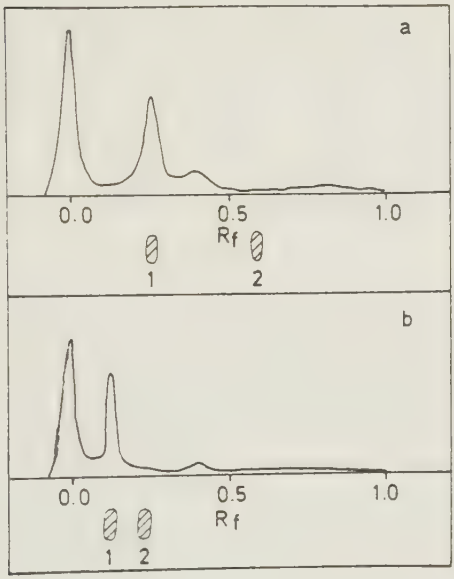


Abbildung 8: Tritiummarkierung von Gibberellinderivaten. Dünnschichtchromatogramme der Reaktionsansätze mit relativer Radioaktivität.
a Reduktion von GA_9-17-Norketon,
b Reduktion von GA_3-17-Norketon.
Referenzen: 1 = reduziertes Norketon,
2 = Norketon von GA_9 bzw. GA_3.

Radioaktivitätsbestimmungen ergaben für die isolierten Derivate Totalaktivitäten von 3.6 mCi (17-OH-GA_3) und 0.3 mCi (17-OH-GA_9). Dies entsprach Ausbeuten von 3.8 bzw. 0.3 % der eingesetzten Radioaktivität. Die Verbindungen zeigten auch nach drei Jahren keinen Aktivitätsverlust oder chemische Instabilität. Die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der radioaktiv markierten Antigene erfolgte nach der Methode von CHERVU und MURTY (1975; Kapitel III.2.3.).

Nach der oben beschriebenen Vorschrift wurden auch die Norketone von GA_1, GA_4 und GA_7 synthetisiert und mit NaB^3H_4 reduziert. Die markierten Derivate zeigten jedoch keine Immunreaktivität mit den entsprechenden Antiseren.

1.3. Enzymmarkierung von Gibberellinen

Neben Radioimmuntests werden für Phytohormone auch Enzymimmuntests als spezifische und empfindliche Bestimmungsmethoden eingesetzt (WEILER, 1982). Dabei wurde im Falle der IES mit dem Emzymimmuntest eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit um den Faktor 1o gegenüber dem Radioimmuntest erreicht (WEILER, 1981; WEILER et al., 1981).

Alkalische Phosphatase ist in reiner Form mit hoher spezifischer Aktivität (> 2500 Units/mg Protein) erhältlich. Zur Kopplung von Gibberellinen an das Enzym bietet sich die bereits bei der Immunogensynthese (Kapitel III.1.1.) angewendete Methode an, nämlich die Aktivierung der Carboxylgruppe des Gibberellins über das Anhydrid und die Reaktion mit Aminogruppen des Enzyms. Dieser Syntheseweg hat den Vorteil, daß die Kopplung an der gleichen Stelle erfolgt wie beim Immunogen und somit keine zusätzliche funktionelle Gruppe als antigene Determinante ausscheidet. Am Beispiel der GA_4 ist die Synthese eines Gibberellin-Enzymkonjugates in Ab-

bildung 9 aufgeführt:

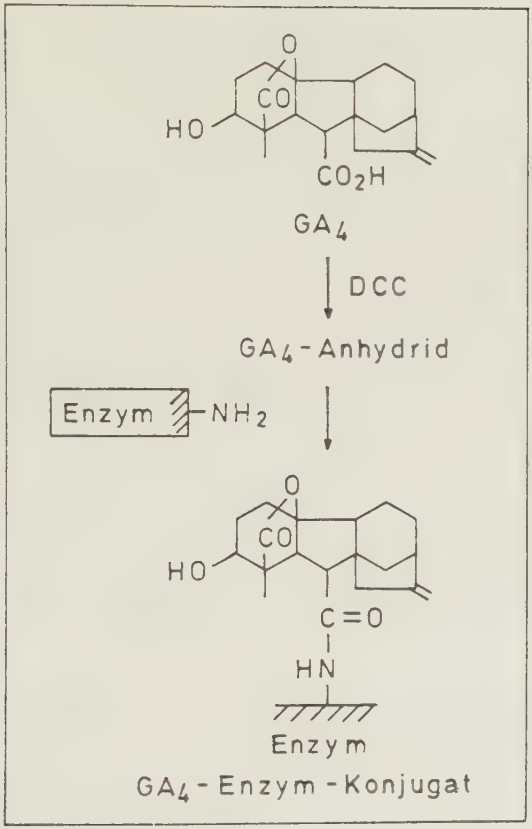


Abbildung 9: Kopplung von GA_4 an alkalische Phosphatase. DCC = Dicyclohexylcarbodiimid; Enzym = alkalische Phosphatase.

Die Kopplung von GA_3 und GA_4 an alkalische Phosphatase wurde nach der in Kapitel III.1.1. beschriebenen Methode durchgeführt:

2 mg GA_3 (5.8 µMol) bzw. GA_4 (6.0 µMol) reagierten mit 0.6 mg (3.0 µMol) DCC in 100 µl wasserfreiem

Dioxan 26 Stunden bei Raumtemperatur. Nach Zentrifugation wurden die klaren Überstände in 10-µl-Mengen schrittweise zu jeweils 0.3 ml Lösung alkalischer Phosphatase gegeben (1 mg Enzym in 100 µl 3 mM Triäthanolaminpuffer pH 7.6, mit 3 M NaCl, 1 mM $MgCl_2$, und 1 mM $ZnCl_2$ und 200 µl DMF). Nach zwei Stunden wurden die Reaktionsansätze mit 0.01 M HCl auf pH 7.0 eingestellt und reagierten weitere 16 Stunden bei Raumtemperatur. Jede Lösung wurde drei Tage bei 4°C gegen 5 l TBS pH 7.8 (täglich gewechselt) dialysiert, die Dialysate mit je 0.3 ml Glycerol und 5o mM TRIS pH 7.8 auf 1 ml Volumen eingestellt und bei -18°C aufbewahrt.

Die Ausbeuten der Ansätze betrugen für das GA_3-Enzymkonjugat 21 %, für das GA_4-Enzymkonjugat 17 % der jeweils eingesetzten Enzymaktivität. Die Derivate zeigten nach zwei Jahren einen Aktivitätsverlust von ca. 3o %.

2. Aufbau von Radioimmuntests für GA_1, GA_3 und GA_9

Mit den radioaktiv markierten Derivaten von GA_1, GA_3 und GA_9 wurden zunächst alle entsprechenden Antiseren auf Bindung getestet. Die Fraktionen mit den besten Bindungseigenschaften wurden jeweils zusammengefaßt, danach die Testbedingungen optimiert, eine Charakterisierung der Antikörper in den benutzten Seren vorgenommen und die Empfindlichkeit der Tests bestimmt. Die Versuche zur Spezifität der Tests durch Bestimmung der Kreuzreaktionen sind im Vergleich mit den entwickelten Enzymimmuntests (Kapitel III.3.) in einem gesonderten Kapitel (III.4.1.) beschrieben.

2.1. Optimierung der Antigen-Antikörper-Reaktion

Die durchgeführten Bindungstests ergaben in allen Fällen eine etwa um den Faktor 10 höhere Bindung der Methylester der radioaktiv markierten Antigene an die spezifischen Antikörper im Vergleich zu den jeweiligen freien Säuren. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in der strukturellen Ähnlichkeit der Methylgruppe mit der Carbonylgruppe in der Amidbindung des entsprechenden Immunogens, gegen das die Antikörper induziert wurden. Diese erkennen solche Strukturen besser als eine freie Carboxylgruppe. Alle markierten Gibberelline wurden deshalb als Methylester in den Radioimmuntests eingesetzt.

Bei der Wahl des Puffers und des pH der Reaktionslösung, der günstigsten Inkubationsbedingungen und -zeiten während der Reaktion der Antigene mit den Antikörpern sowie der optimalen Endsättigung der Ammoniumsulfatlösung, welche zur

Präzipitation der Antigen-Antikörper-Komplexe verwendet wurde, ergab sich, daß für alle markierten Gibberelline die von WEILER und WIECZOREK (1981) beschriebenen Bedingungen für den GA_3-Radioimmuntest optimal waren: Als Puffer der Reaktionslösung diente die physiologisch gepufferte Kochsalzlösung (PBS pH 7.4), nach zwei Stunden Inkubation der Reaktanden bei Raumtemperatur wurde mit 1.2 ml 9o % gesättigtem Ammoniumsulfats gefällt und nach 30 Minuten Inkubation zentrifugiert und mit Ammoniumsulfat (1.0 ml 52 % gesättigte Lösung) gewaschen. Ein Schema des Ablaufs der Gibberellin-Radioimmuntests wurde schon in Kapitel II.4.1. (Tabelle 1) dargestellt.

2.2. Eigenschaften der Antiseren

Antiseren werden durch ihren Titer, ihre Affinität und ihre Spezifität gekennzeichnet. Als Titer bezeichnet man diejenige Konzentration an Antikörpern, welche einen bestimmten Prozentsatz des eingesetzten markierten Antigens bindet.

Von den Antiserumfraktionen, die bei Einsatz im Überschuß die höchste Bindung mit dem entsprechenden markierten Antigen aufwiesen, wurden verschiedene Verdünnungen hergestellt und ebenfalls getestet. Die Fraktionen eines Tieres, welche bei 3o % spezifischer Bindung Titer von 1 : 900 Endverdünnung im Test (= 1 : 100 Verdünnung der Antiseren) oder mehr hatten, wurden zu einem Serum zusammengefaßt. Wie in Abbildung 10 zu sehen ist, liegen 3o % spezifische Bindung im linearen Bereich der Titerkurve. Bei 3o % (GA_3 und GA_9) bzw. 35 % (GA_1) spezifischer Bindung wurden alle weiteren Immuntests durchgeführt.

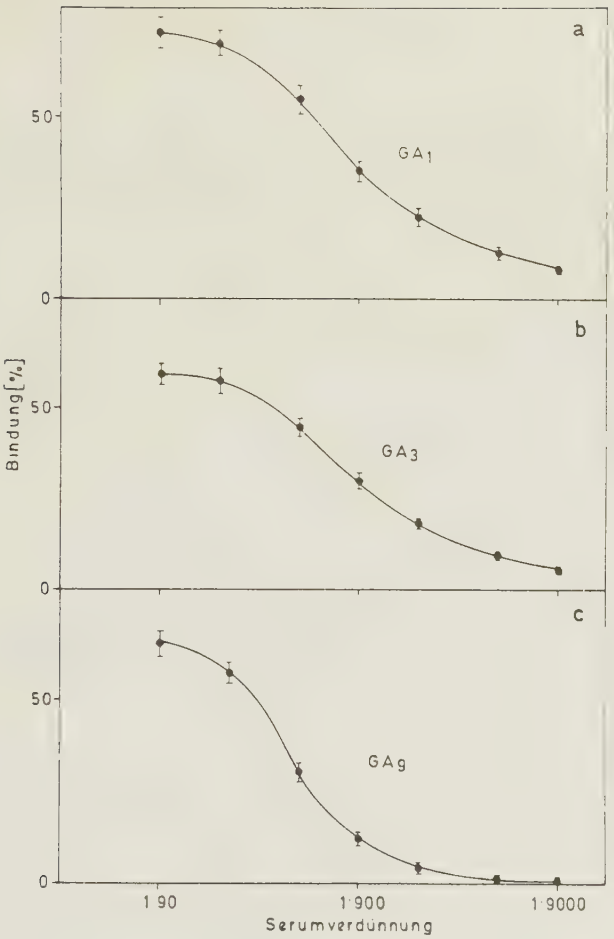


Abbildung 10: Titerkurven der für die Gibberellin-Radioimmuntests verwendeten Seren. Ordinate: Spezifische Bindung (%); Abszisse: Eingesetzte Serumendverdünnung.

Bei dem Vergleich der Bindungseigenschaften des tritiummarkierten 17-OH-GA_3-Methylesters mit denen des erwähnten ^{125}Jod-markierten Antigens ergaben sich folgende Unterschiede: Während Seren zweier Tiere mit dem jodmarkierten Antigen fast durchweg eine hohe Bindung bei Einsatz der Antikörper im Überschuß (1:10-Verdünnung der Antiseren) zeigten (mehr als 70%)und die eines weiteren Tieres unter gleichen Bedingungen nur eine

niedrige Bindung aufwiesen, zeigten einige Fraktionen dieses Tieres mit dem tritiummarkierten Antigen spezifische Bindungen von mehr als 5o %. Sie wurden zu einem Serum zusammengefaßt.

Die unterschiedlichen Bindungseigenschaften derselben Antikörper mit beiden Antigenen lassen sich mit ihrer verschiedenen chemischen Struktur erklären: Bei der Markierung mit ^{125}J wurde direkt am Molekül nur die Carboxylgruppe der Gibberellinsäure chemisch verändert, die Tritiummarkierung dagegen erforderte eine Modifikation der Molekülstruktur in Ring D (Abbildung 11). Aufgrund der Struktur des Immunogens (Kopplung der GA_3 über die Carboxylgruppe an RSA) ist zu erwarten, daß die Mehrzahl der Antikörperpopulationen geringere Affinitäten zu GA_3-Molekülen hat, die in C_{17} chemisch verändert wurden. Eine Bindung an die Brückenmoleküle der jodmarkierten GA_3 ist nicht zu erwarten, da diese beim Immunogen nicht vorhanden sind. Die Methylierung des GA_3-Antigens bewirkt eine der Peptidbindung ähnliche Modifikation der Carboxylgruppe, so daß in diesem Bereich die Strukturen der beiden markierten Antigene und des Immunogens verwandt sind.

Von den gegen GA_9 induzierten Antikörpern, im Überschuß eingesetzt, wiesen nur wenige Fraktionen eines immunisierten Tieres mehr als 5o % spezifische Bindung mit dem entsprechenden markierten Antigen auf und wurden zu einem Serum zusammengefaßt. Da das GA_9-Antigen auf die gleiche Weise markiert wurde wie das der GA_3, sollten die niedrigen Bindungen gleiche Ursachen haben wie am Beispiel des markierten GA_3-Derivates geschildert. Im Falle des als markiertes Antigen eingesetzten [1,2-^{3}H]-GA_1-Methylesters waren durchweg höhere Bindungen mit den GA_1-Antiseren gemessen worden.

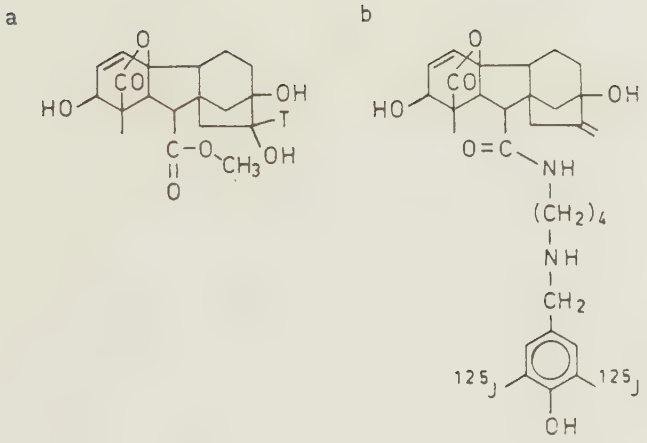


Abbildung 11: a Struktur des tritiummarkierten GA_3-Antigens
b Struktur des ^{125}J-markierten GA_3-Antigens nach WEILER und WIECZOREK (1981).

Die Affinität der Antikörper ist durch die Reaktionsenergie zwischen den Antikörperbindungsstellen und dem Antigen bestimmt. Die Affinitätskonstanten können aus Daten einer Standardkurve in der Auftragung nach SCATCHARD (1949) ermittelt werden, ebenso die Konzentration der eingesetzten Antikörperbindungsstellen. Da die Antigen-Antikörper-Reaktion eine Gleichgewichtsreaktion ist, gilt analog zum Massenwirkungsgesetz folgende Gleichung:

$$\frac{[Ag \cdot Ak]}{[Ag] \cdot [Ak]} = K \qquad (1)$$

Ag · Ak steht für die gebundene Fraktion und soll der Einfachheit halber in den nachfolgenden Gleichungen mit x bezeichnet werden. Ag gibt die freie Antigenmenge, Ak die freie Antikörpermenge an. Somit gelten folgende Beziehungen:

$$\frac{x}{(Ag-x) \cdot (Ak-x)} = K \cdot Ak - K \cdot x \qquad (2)$$

$$\frac{x}{[Ag-x]} = K\,(Ak-x) = K \cdot Ak - K \cdot x = \frac{B}{F} \qquad (3)$$

B/F ist der Quotient aus gebundenem und freiem Antigen. K · Ak ist konstant, während K · x variabel ist. Trägt man die B/F-Raten gegen die Konzentration des gebundenen Antigens auf (Abbildung 12), so ergibt sich im Idealfall eine Gerade, deren Steigung -K beträgt. Da im Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse B/F = 0 ist, kann man die Konzentration der Antikörperbindungsstellen folgendermaßen ermitteln:

$$O = K\,Ak - K\,x \qquad (4)$$

$$Ak = x \qquad (5)$$

Somit ist die Konzentration der Antikörper durch den Schnittpunkt der Geraden mit der Abszissen festgelegt.

Tabelle 4 zeigt die Affinitätskonstanten und Konzentrationen der Antikörperbindungsstellen der in den Radioimmuntests verwendeten Antiseren. Die Werte bewegen sich in den gleichen Größenordnungen wie in bereits entwickelten Radioimmuntests für Phytohormone (WEILER, 1979, 198o, 1981; WEILER et al., 1981; WEILER und WIECZOREK, 1981).

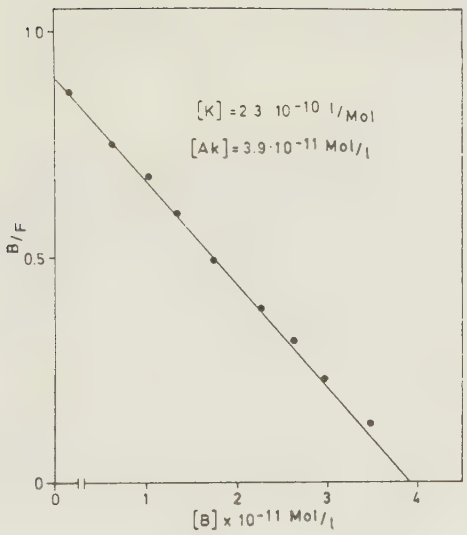


Abbildung 12: Scatchard-Plot der Standardkurve des GA_1-Radioimmuntests.

Tabelle 4: Affinitätskonstanten und Konzentration der Antikörperbindungsstellen der in den Radioimmuntests verwendeten Antiseren.

	Antikörper induziert gegen		
	GA_1-RSA	GA_3-RSA	GA_9-RSA
K(10^{10} l/Mol)	2.3	1.7	1.9
Ak(10^{-11} Mol/l)	3.9	4.1	3.9

2.3. Empfindlichkeit der Gibberellin-Radioimmuntests

Zur Auswertung von Immuntests dienen Standardkurven. Dazu wird eine konstante Menge von Antikörpern und markiertem Antigen mit steigenden Mengen unmarkierten Antigens inkubiert. Die zunehmende Verdrängung des markierten Antigens aus der gebundenen Phase ist meßbar in der Abnahme von Radioaktivität bzw. Enzymaktivität und kann in einer Standardkurve dargestellt werden.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten der graphischen Auftragung von Standardkurven (vgl. CHARD, 1978). Für die vorliegende Arbeit wurde die logit-log-Transformation nach RODBARD (1974) gewählt (s. Kapitel II.4.3.). Abbildung 13 zeigt die linearisierten Kurven für die Radioimmuntests von GA_1, GA_3 und GA_9. Als unmarkierte Antigene wurden die Methylester der Gibberelline eingesetzt. Es zeigte sich nämlich, daß dann die Tests etwa 100 mal empfindlicher waren als bei Benutzung der freien Säuren.

Aus den Kurven kann man Parameter ersehen, die für die Charakterisierung von Immuntests wichtig sind: Den Meßbereich des Tests und den 5o % B/B_o-Wert, welcher die Menge unmarkierten Antigens angibt, die benötigt wird, um die Hälfte des eingesetzten markierten Antigens aus dem Bindungsbereich der Antikörper zu verdrängen. Er kann als einfaches Maß für die Empfindlichkeit eines Tests benutzt werden und ist wichtig für die Bestimmung von Kreuzreaktionen (Kapitel III.4.1.). In der gezeigten Auftragung ist der 5o % B/B_o-Wert identisch mit dem Nullpunkt der Ordinaten.

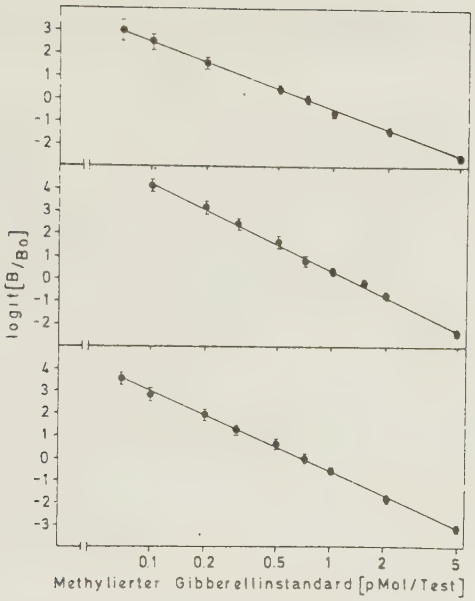


Abbildung 13 : Standardkurven von GA_1 (oben), GA_3 (Mitte) und GA_9 (unten).

Die Meßbereiche der Standardkurven der Gibberellin-Radioimmuntests liegen zwischen 0.05 und 5 pMol, die 5o % B/B_o-Werte bei ca. 1 pMol. Dies dokumentiert die hohen Nachweisempfindlichkeiten der entwickelten Tests. Die Werte der unspezifischen Bindungen weisen alle weniger als 0.7% der jeweils eingesetzten Radioaktivität auf (s. Tabelle 5).

Neben der Affinität der Antikörper ist die spezifische Aktivität des markierten Antigens ein wesentlicher Faktor für die Empfindlichkeit eines Immuntests. Die spezifische Aktivität kann auf verschiedene Art und Weise bestimmt werden. Im Falle der radioaktiv markierten Antigene des GA_3- und des GA_9-RIA wurde dazu die "self-displacement"-Methode (CHERVU und MURTY, 1975) benutzt. Sie beruht darauf, daß bei konstanter Anzahl von Antikörpern steigende Mengen markierten Antigens im Test eingesetzt werden. Die B/F-Rate (s. Kapitel III.2.2.) bei steigenden markierten Antigenmengen wird dann mit der von steigenden unmarkierten Antigenmengen verglichen. In Tabelle 5 sind neben den schon erwähnten Testparametern auch die spezifischen Aktivitäten aufgeführt. Die spezifische Aktivität der [1,2-^{3}H]-GA_1 war mit 38 Ci/mMol vom Hersteller angegeben.

Tabelle 5: Wichtige Parameter zur Beschreibung der Gibberellin-Radioimmuntests

Test	Meßbereich [pMol]	B/B_o=5o% [pMol]	unspezifische Bindung [%]	spezifische Aktivität [Ci/mMol]
GA_1	0.07 - 5	0.5	0.7	38
GA_3	0.1 - 5	1.1	0.5	5.9
GA_9	0.1 - 5	0.8	0.5	4.9

3. Aufbau von Enzymimmuntests für GA_3 und GA_4

Wegen der geringen Gibberellingehalte des zu testenden pflanzlichen Materials waren die Nachweisempfindlichkeiten der Radioimmuntests oft nicht ausreichend zur Analyse. Daher sollten mit dem Aufbau von Enzymimmuntests für GA_3 und GA_4 Bestimmungsmethoden entwickelt werden, die noch sensitiver als die Radioimmuntests sind.

Nach Synthese der entsprechenden Gibberellin-Enzymkonjugate wurden damit die zur Verfügung stehenden Antiseren mit Hilfe der Doppel-Antikörpermethode (s. Kapitel III.3.1.) auf Bindung getestet. Von Fraktionen, die die größte Immunreaktivität zeigten, wurden Immunglobuline isoliert (Kapitel II.3.) und mit diesen ein Festphasen-Enzymimmuntest für GA_3 bzw. GA_4 aufgebaut. Nachdem geeignete Testbedingungen gefunden waren, wurden die Eigenschaften der verwendeten Antiseren charakterisiert und die Tests standardisiert. Die Untersuchungen zur Spezifität der EIAs sind in einem gesonderten Kapitel (III.4.1.) aufgeführt.

3.1. Optimierung der Antigen-Antikörper-Reaktion

Die Trennung der freien von den gebundenen Antigenen konnte nicht wie im Falle der Radioimmuntests mit Hilfe einer Ammoniumsulfatfällung durchgeführt werden, weil dabei auch das freie Gibberellin-Enzymkonjugat präzipitieren kann. Es mußte also eine andere Trennmethode gewählt werden. Geeignet sind z.B. der Festphasentest, dessen Prinzip darin besteht, daß die Antikörper an eine

feste Phase wie bestimmte Kunststoffe, Sepharose oder Papier etc. durch Adsorption bzw. kovalent gebunden werden (vgl. SMITH und GEHLE, 1980). Polystyrolplatten, die eine effektive Beschichtung mit den Antikörpern und eine präzise Testdurchführung erlauben, sind seit einiger Zeit im Handel erhältlich. Zur Adsorption der Antikörper können aber nicht die ungereinigten Antiseren, sondern nur ihre IgG-Fraktionen verwendet werden (S. ENGVALL, 1980). Diese Methode wäre zur Ermittlung der Immunreaktivität angesichts etwa 300 Antiserumfraktionen zu zeitaufwendig gewesen. Daher wurden die Bindungstests mit der sogenannten Doppel-Antikörper-Methode, die auch schon bei RIAs Anwendung fand, durchgeführt (vgl. MIDGLEY und HEPBURN, 1980). Bei dieser Technik werden gegen Kaninchenantiseren z.B. in Ziegen oder Schafen induzierte Immunglobuline verwendet. Im Test bewirken sie eine Fällung durch Bildung wasserunlöslicher Komplexe sowohl der freien als auch der antigengebundenen Antikörper. Die gebundene Phase kann durch Zentrifugation des Präzipitats von den freien Antigenen getrennt werden. Die Bindungstests der Gibberellin-Enzym-Konjugate mit den entsprechenden Antiseren wurden nach folgender Methode durchgeführt:

50 µl GA-Enzymkonjugat, verdünnt in TBS, mit einer Aktivität von 0.45 mU (E_{405} = 1.0 nach 60 min), reagierte zusammen mit 50 µl 1 : 100 verdünntem Antiserum zwei Stunden bei 4°C. Das Gesamtvolumen der Reaktionslösung, die außerdem noch 200 µl TBS und 100 µl H_2O (oder 100 µl unmarkiertes Antigen) enthielt, betrug 400 µl. Zur Ermittlung der UB-Werte wurde wurde statt des GA-Antiserums die gleiche Konzentration unspezifischen Kaninchenserums verwendet. Nach Ende der Inkubation wurden 50 µl 1 : 25 verdünntes Kaninchenserum und 100 µl der gelösten zweiten Antikörper (1.3 U/Ansatz) zugegeben und nach Inkubation über Nacht bei 4°C zehn

Minuten zentrifugiert (3500 u min^{-1}). Das Pellet wurde je zweimal in 1 ml TBS aufgenommen und zentrifugiert, danach in 0.5 ml 4.6 mM p-Nitrophenylphosphat (gelöst in 50 mM $NaHCO_3$, pH 9.6) aufgenommen und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde wie beschrieben (Kapitel II.4.) die Enzymaktivität gemessen.

Von den Antiserumfraktionen, die mit dem markierten GA_3- bzw. GA_4-Antigen die höchste Bindung zeigten, wurden die IgG-Fraktionen nach der Methode von HURN und CHANTLER (1980; s. Kapitel II.3.) isoliert. Es folgte der Aufbau von Festphasen-Enzymimmuntests. Dazu wurde zuerst die optimale IgG-Konzentration zur Beschichtung der Testplatten ermittelt, danach die Menge an Enzymkonjugat, die die größte Differenz zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung ergab.Das Erreichen niedriger UB-Werte war abhängig von der Inkubationszeit und der Behandlung der Microtestplatten vor und nach der Reaktion der Antikörper mit den GA-Enzymkonjugaten:So genügte für den GA_3-EIA ein Waschen der Platten mit Leitungswasser, während im GA_4-EIA zur Senkung der unspezifischen Bindung auf 15% nach Reaktion der Antigene mit den Antikörpern der Einsatz eines Detergens (Tween 20) notwendig war,um unspezifisch an die Festphase adsorbiertes markiertes Antigen zu entfernen.Die für die beiden entwickelten Enzymimmuntests jeweils optimalen Parameter sind im folgenden beschrieben:

GA_3-EIA: Polystrol-Microtestplatten wurden mit 200 µl IgG/Ansatz (10 mg/l in 50 mM $NaHCO_3$ pH 9.6) beschichtet. Nach drei Tagen Stehen bei 4°C wurde die IgG-Lösung abdekantiert und in jede Probenvertiefung folgende Lösungen pipettiert: 50 µl GA_3-Enzymkonjugat in TBS mit einer Aktivität von 0.83 mU (E_{405} = 1.0 nach 6 h), 50 µl TBS und 100 µl Standard bzw. zu messende Probe. Zur Bestimmung des B_o-Wertes wurden

anstelle des Standards 100 µl H_2O verwendet; zur Bestimmung des UB-Wertes wurde ein Überschuß an unmarkiertem Antigen, welcher das markierte Antigen maximal verdrängt (10 pMol) benutzt. Die Platten wurden kurz geschüttelt, 16 Stunden bei 4°C inkubiert, die Überstände abdekantiert und die Platten dreimal mit Leitungswasser gewaschen. Mit je 0.2 ml p-Nitrophenylphosphat (s. Doppel-Antikörper-Methode) reagierten die Proben sechs Stunden bei 37°C, danach wurde die Reaktion mit je 50 µl 5 M KOH gestoppt und die Enzymaktivität wie beschrieben bestimmt. Die maximal gebundene Aktivität betrug 0.075 mU, dies entsprach einer Bindung von 9 %.

GA_4-EIA: Platten wurden mit IgG-Lösung (25 mg/l) unter den gleichen Bedingungen wie für den GA_3-EIA beschichtet. Nach Abdekantieren wurde mit je 200 µl einer Lösung von 0.05 % (v,v) Tween 2o in 0.9 % (w,v) NaCl zehn Minuten inkubiert und anschließend zweimal mit TBS und einmal mit Leitungswasser gewaschen. Die Reaktion der Antigene mit den Antikörpern erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie beschrieben, mit einer Ausnahme: Zur Bestimmung des UB-Wertes wurden 100 pMol des unmarkierten Antigens verwendet. Nach der Inkubation wurden die Platten auf die gleiche Weise behandelt wie vor Beginn der Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Proben wurden in p-Nitrophenylphosphatlösung aufgenommen und reagierten acht Stunden wie beschrieben. Die maximal gebundene Enzymaktivität betrug 0.056 mU, was 6 % spezifische Bindung ergab.

3.2. Eigenschaften der Antikörper

Die in den Festphasen-Enzymimmuntests verwendeten Antikörper wurden von den GA_3- und $GA_{4/7}$-Konjugaten induziert, deren Synthese in Kapitel III.1.1. beschrieben ist. Durch Immunisierung mit Proteinkonjugaten der reinen Gibberelline GA_4 bzw. GA_7 erhaltene Antiseren zeigten zwar mit dem GA_4-Antigen Bindung bei Anwendung der Doppel-Antikörpermethode, nicht aber im Festphasentest. Dort betrugen die maximalen spezifischen Bindungen der markierten Gibberellin-Antigene mit den GA_3- bzw. $GA_{4/7}$-Antikörpern 9 bzw. 6 %. Bei Einsatz von Antikörpern im Überschuß erreichten die maximalen Bindungen Werte von 63 % (GA_3) und 58 % (GA_4).

Mit Hilfe des Scatchard-Plots wurden wie bei den Radioimmuntests beschrieben (s. Kapitel III.2.2.) die Konzentration der Antikörperbindungsstellen in den Tests und die Affinitätskonstanten für die Fraktionen der benutzten GA_3- und $GA_{4/7}$-Antiseren ermittelt (s. Tabelle 6). Vergleicht man die Werte mit den Konstanten, die für die Radioimmuntests errechnet wurden (Kapitel III.2.2., Tabelle 4), so ist zu sehen, daß alle Werte sich in der gleichen Größenordnung bewegen.

Tabelle 6: Affinitätskonstanten und Konzentration der Antikörperbindungsstellen der in den Enzymimmuntests verwendeten Antikörper.

	Antikörper induziert gegen	
	GA_3-RSA	$GA_{4/7}$-RSA
$K(10^{10}$ l/Mol)	5.2	5.0
$Ak(10^{-11}$ Mol/l)	3.6	4.5

3.3. Empfindlichkeit der Gibberellin-Enzymimmuntests

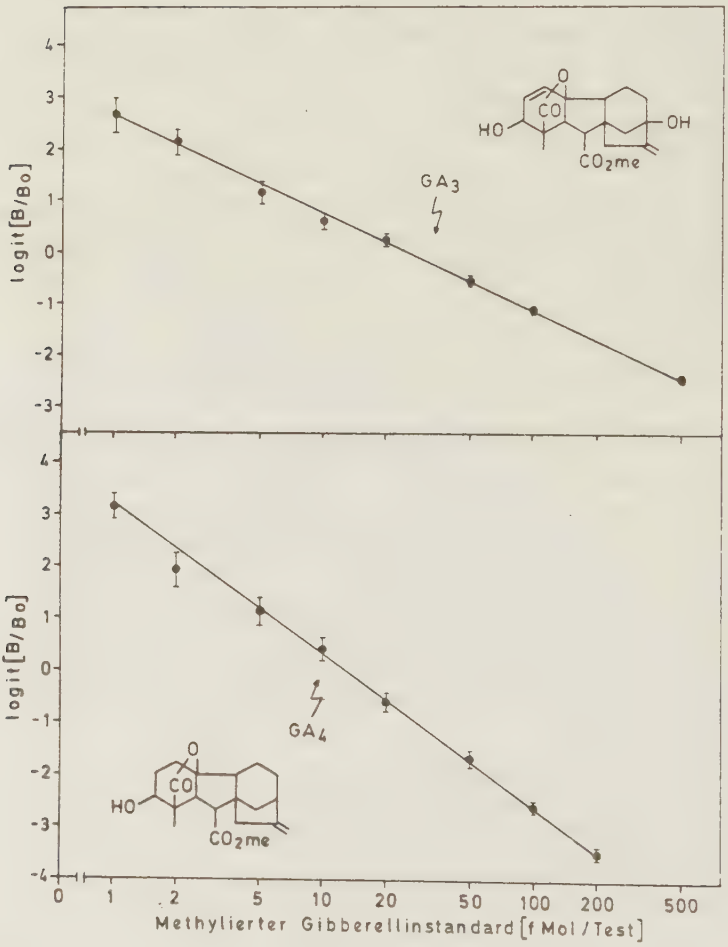


Abbildung 14 : Standardkurven von GA_3 und GA_4 in der logit-log-Auftragung.

Wie bei den Radioimmuntests (Kapitel III.2.3.) beschrieben wurden die Enzymimmuntests für GA_3 und GA_4 mit den Methylestern der Gibberelline standardisiert.Vergleicht man die Meßbereiche der EIAs (Abbildung 14) mit denen der RIAs (Abbildung 13),so ist eine Steigerung der Empfindlichkeit um etwa den Faktor 100

festzustellen.Die B/B_0=50% Werte betragen für d en GA_3-Methylester 26 fMol,für den GA_4-Methylester 13 fMol.Der lineare Meßbereich des GA_3-EIA umfaßt 1 - 500 fMol,der des GA_4-EIA ebenfalls.Die untersten Nachweisgrenzen betragen für GA_3-Methylester 0.5 fMol,für GA_4-Methylester 1 fMol.Die Werte für die unspezifischen Bindungen erreichen 10% (GA_3-EIA) bzw. 15% (GA_4-EIA) der in den Festphasentests gemessenen maximalen Enzymaktivitäten.Die UB-Werte für die entwickelten RIAs sind mit weniger als 1% beträchtlich niedriger.

Die spezifischen Aktivitäten der enzymmarkierten Gibberelline wurden nach der gleichen Methode wie in Kapitel III.2.2. beschrieben ermittelt.Sie betragen für das markierte GA_3-Antigen 15 U/nMol,für das markierte GA_4-Antigen 12 U/nMol. Die für die Enzymimmuntests charakteristischen Parameter sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tabelle 7 : Wichtige Parameter zur Beschreibung der Gibberellin-Enzymimmuntests-

Test	Meßbereich fMol	B/B_0 = 50% fMol	unspezifische Bindung %	spezifische Aktivität U/nMol
GA_3	1 - 500	26	10	15
GA_4	1 - 500	13	15	12

4. Spezifität, Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Immuntests

Die Spezifität eines Immuntests ist primär von der Immunogensynthese, d. h. über welche funktionelle Gruppe das Hapten an das Trägerprotein gebunden wird, abhängig (EXLEY et al. 1971; KUSS et al., 1972). Antikörper werden nämlich hauptsächlich gegen diejenigen antigenen Determinanten, d.h. gegen funktionelle Gruppen des Antigens, gebildet, die nicht in unmittelbarer Nähe der Kopplungsstelle lokalisiert sind (LANDSTEINER, 1945). Dies impliziert, daß die Reaktion von Antikörpern mit Molekülen, die zwar dem Hapten verwandte Strukturen aufweisen, sich aber von diesem im Kopplungsbereich unterscheiden, möglich ist. Ein Antiserum enthält sowohl Antikörperpopulationen, die gegen alle Strukturen des Haptens, sofern es eine bestimmte Größe nicht überschreitet, immunreaktiv sind, als auch solche, die nur gegen bestimmte Teilbereiche eines Moleküls affin sind (KABAT, 1971).

Die bisher bekannten Gibberelline kann man in zwei Gruppen einteilen: Einmal die C_{19}-Gibberelline, d.h. solche mit einem Lactonring meist von C_4 nach C_{10}, zum anderen die C_{20}-Gibberelline, welche diesen Ring entweder nicht besitzen oder ein erweitertes Lacton aufweisen (vgl. GRAEBE und ROPERS, 1978). Die Gibberelline, für die Radio- und Enzymimmuntests entwickelt worden waren, sind sämtlich C_{19}-Gibberelline. Die in den Tests verwendeten Antikörper sollten möglichst in der Lage sein, zwischen diesen beiden Gruppen zu differenzieren und darüber hinaus noch andere funktionelle Gruppen des Gibberellanringes selektiv zu erkennen. Ferner sollten sie keine Immunreaktivität gegen strukturverwandte Moleküle wie Kauren und ähnliche Derivate zeigen, und schließlich war es wünschenswert, daß sie zwischen freien Gibberellinen und Gibberellinkonjugaten unterscheiden konnten. Daher

wurden bei der Bestimmung der Kreuzreaktionen in Kapitel 4.1. alle verfügbaren Gibberelline und ähnliche Moleküle verwendet.

Die genaue Bestimmung eines einzigen Gibberellins mit Hilfe eines Immuntests z.B. in Pflanzenextrakten ohne vorherige Reinigungsschritte ist nur bei sehr hoher Spezifität der Antikörper möglich. Dies war in vielen der aufgestellten Tests nicht der Fall, wie das folgende Kapitel zeigen wird. Daher mußten Wege gefunden werden, wie z.B. durch dünnschichtchromatographische Reinigung der Gibberelline in Extrakten und durch Einsatz mehrerer Immuntests unterschiedlicher Spezifitäten für die Bestimmung eines Gibberellines, um trotzdem genaue Analysewerte zu erhalten (Kapitel 4.2.).

Von Bedeutung ist ferner, daß die vorgenommenen Mehrfachbestimmungen geringe Standardabweichungen haben und wichtige Testparameter wie z.B. der Meßbereich konstant bleiben. Ein Kriterium zur Anwendbarkeit quantitativer Meßverfahren ist auch die Linearität der Ergebnisse von Extraktverdünnungsreihen. Diese genannten Faktoren wurden ebenfalls in Kapitel 4.2. untersucht.

4.1. Untersuchungen zur Spezifität der Tests

Zur Charakterisierung der Spezifität von Radio- und Enzymimmuntests dient die Bestimmung von Kreuzreaktionen. Man versteht darunter das Ausmaß der Reaktion der gegen eine Substanz induzierten Antikörperpopulationen mit Verbindungen chemisch ähnlicher Struktur. Kreuzreaktionen werden ermittelt durch den Vergleich der Standardkurve für das Antigen mit den Standardkurven für die betreffenden Substanzen. Der charakteristische Vergleichswert ist der 50 % B/B_o-Wert der Standardkurve auf molarer Basis. Die Kreuzreaktionen werden dann nach folgender Gleichung (s. LANDON, 1976) berechnet:

$$KR\ (\%) = \frac{50\ \%\ B/B_o\ \text{Antigen}}{50\ \%\ B/B_o\ \text{Testsubstanz}} \times 100$$

Die Auswahl der zur Bestimmung von Kreuzreaktionen verwendeten Substanzen wurde nach folgendem Kriterium getroffen: Es sollte ermittelt werden, gegen welche molekularen Strukturen des jeweiligen Gibberelin-Antigens die Antikörper reagieren. Dabei spielten z.B. das Substitutionsmuster des ent-Gibberellan-Grundgerüsts, die Möglichkeit der Unterscheidung zwischen freien Gibberellinen und Konjugaten oder die Art des Lactons im A-Ring eine Rolle. Unter den zu testenden Verbindungen sollten zudem möglichst alle Gibberelline und unmittelbaren Gibberellinvorstufen sein, denen eine physiologische Bedeutung in höheren Pflanzen zugeschrieben wird. Nicht alle gewünschten Substanzen waren in ausreichenden Mengen zur Bestimmung von Kreuzreaktionen verfügbar.

Wie schon erwähnt zeigten in jedem der entwickelten Immuntests die Methylester der unmarkierten Antigene eine höhere Affinität zu den Antikörpern als die freien Säuren (Kapitel

III.2.3. und 3.3.).

Daher wurden auch zur Bestimmung der Kreuzreaktionen die Verbindungen, welche alle eine freie Säuregruppe aufweisen, methyliert und in entsprechenden Verdünnungen getestet. Tabelle 8 zeigt die Ergebnisse der Tests auf Kreuzreaktion von Gibberellinen und ähnlichen Substanzen mit allen markierten Antigenen.

Die Ergebnisse der Kreuzreaktionen lassen unterschiedliche Spezifitätsgrade bei den Antiseren erkennen. Generell aber können alle in den Tests eingesetzten Serumfraktionen zwischen Gibberellinen und solchen Derivaten unterscheiden, deren Strukturen starke Unterschiede zum ent-Gibberellangerüst aufweisen: So reagieren in allen Tests die Antikörper nicht mit Helminthosporsäure und Gibberethion, aber auch nicht mit Steviol. Diese Verbindung trägt im Ring B sechs statt fünf C-Atome. Dem Steviol strukturverwandte Verbindungen wie Kaurensäure, Kauren und andere direkte Gibberellinvorstufen waren zum Zeitpunkt der Kreuzreaktionsbestimmungen nicht in ausreichenden Mengen verfügbar; es ist aber zu erwarten, daß auch diese Verbindungen nicht mit den Gibberellinantikörpern reagieren. Fast keine Reaktion in den Tests zeigt auch GA_8-Glucosid. Gibberelline, die im Ring A nicht das Lacton von C_4 nach C_{10} besitzen sowie die Derivate der Gibberinsäure, werden bis auf zwei Ausnahmen (iso-GA_3 und iso-GA_7 im GA_1-RIA und im GA_4-EIA) ebenfalls von den Antikörpern fast nicht erkannt; die Kreuzreaktionen liegen alle unter 0.1 %. GA_{32} als einziges getestetes C_{19}-Gibberellin mit einer Hydroxylgruppe am C-Ring wird von den Bindungsstellen der Antikörper nur in geringem Ausmaß erfaßt (lediglich im GA_4-EIA 3.5 % Kreuzreaktion).

Weniger einheitlich sind die Ergebnisse der Kreuzreaktionen mit Gibberellinen, die in Ring A und Ring D unterschiedliche Hydroxylierungsmuster aufweisen. Die größte Spezifität auch in dieser Hinsicht besitzen die im GA_9-RIA verwendeten Antikörper: Lediglich GA_4 als 3-β-Hydroxy-GA_9 zeigt eine schwache Kreuzreaktion (3 %). Gibberelline mit einer Doppelbindung in A-Ring (GA_3 und GA_7) werden nicht erfaßt.

Nicht ganz so spezifisch sind die Antikörper im GA_4-EIA: Die hohe Kreuzreaktion von 80 % mit GA_7 war allerdings zu erwarten, weil die Antikörper durch ein $GA_{4/7}$-Proteinkonjugat induziert wurden. Die Ergebnisse lassen aber erkennen, daß in der Regel jede im Vergleich zu GA_4 bzw. GA_7 zusätzliche oder fehlende OH-Gruppe zu nur geringen Reaktionen mit dem Antiserum führt. Eine Ausnahme bildet GA_1 mit 13 % Kreuzreaktion. Die im GA_3-EIA bzw. GA_3-RIA verwendeten Antikörper wurden von zwei verschiedenen Immunogenen in den Tieren induziert. Die unterschiedlichen Kopplungsmethoden, nämlich in einem Fall über das Anhydrid der GA_3 und im anderen Fall über ein gemischtes Anhydrid (s. Kapitel III.1.1.) hatten, wie die Daten in Tabelle 8 zeigen, keinen Einfluß auf die Spezifität der Antikörper: In beiden Fällen weichen die Ergebnisse der Kreuzreaktionen nur geringfügig voneinander ab. Die Resultate stimmen auch mit den von WEILER und WIECZOREK (1981) ermittelten Spezifitäten im ^{125}-J-GA_3-RIA überein. Die höchsten Kreuzreaktionen ergeben sich mit GA_7 (35 - 4o %) und GA_{20} (22 %). GA_7 ist im A-Ring mit GA_3 chemisch identisch, GA_{20} jedoch nur im D-Ring. Dies deutet auf die Existenz mehrerer Antikörperpopulationen, die zu bestimmten Teilstrukturen des GA_3-Moleküls unterschiedliche Affinitäten aufweisen, hin. Die chemisch der GA_3 sehr ähnliche GA_1 reagiert in geringerem Maße (11 - 13 %) mit den GA_3-Antikörpern. Die Immuntests für GA_3 weisen also einen ähnlichen Spezifitätsgrad auf wie der GA_4-Enzymimmuntest.

Im Vergleich dazu werden zweifellos die unspezifischsten Antikörper im GA_1-RIA verwendet.Hohe Kreuzreaktionen mit den Antikörpern zeigen GA_3 und GA_7 (je 70%),GA_{20} (55%), GA_4 (40%) und GA_5 (29%).GA_7 ist wie GA_4 der GA_1 in Ring A strukturell sehr ähnlich.Daß GA_{20} und GA_8 gut von den Antikörpern erkannt werden,zeigt,daß Populationen vorhanden sein müssen,die eine hohe Affinität zum D-Ring des Moleküls besitzen.Dies mag auch der Grund für die nicht geringe Kreuzreaktion von iso-GA_3 (10%) im GA_1-RIA sein.Das gleiche Phänomen ist im GA_4-EIA für iso-GA_7 zu beobachten.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß mit Ausnahme des GA_9-RIA alle anderen entwickelten Immuntests, insbesondere aber der GA_1-RIA, den spezifischen Nachweis von jeweils nur einem Gibberellin ohne den Tests vorgeschaltete Trennmethoden nicht erlauben. Das folgende Kapitel (4.2.) wird unter anderem Verfahren schildern, die spezifische Gibberellinbestimmungen mit Hilfe der aufgestellten Immuntests trotzdem ermöglichen.

Tabelle 8 (a):Kreuzreaktionen der markierten Antigene mit Verbindungen ähnlicher chemischer Struktur (% KR auf molarer Basis).

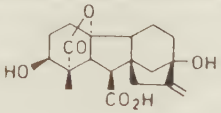
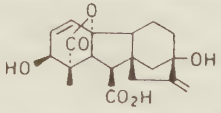
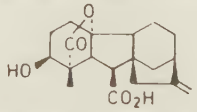
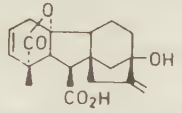
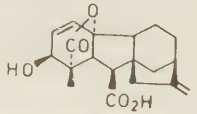
Substanz		Kreuzreaktion (%)				
Strukturformel	Name	GA_1-RIA	GA_3-RIA	GA_9-RIA	GA_3-EIA	GA_4-EIA
	GA_1	100	11	0.1	13	13
	GA_3	70	100	< 0.1	100	< 0.1
	GA_4	40	9	3	7	100
	GA_5	29	0.2	<0.1	<0.1	0.1
	GA_7	70	35	1.1	40	80

Tabelle 8 (b) : Kreuzreaktionen

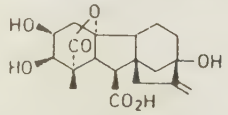
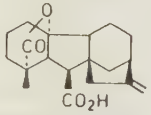
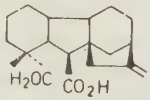
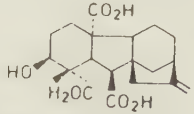
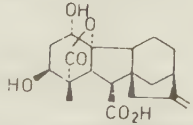
Substanz		Kreuzreaktion (%)				
Strukturformel	Name	GA_1-RIA	GA_3-RIA	GA_9-EIA	GA_3-EIA	GA_4-EIA
	GA_8	15	<0.1	<0.1	<0.1	0.5
	GA_9	15	<0.1	100	<0.1	<0.1
	GA_{12}	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	GA_{13}	0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	GA_{16}	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1

Tabelle 8 (c) : Kreuzreaktionen

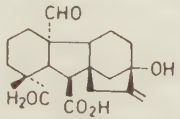
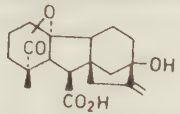
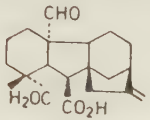
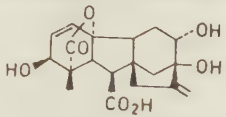
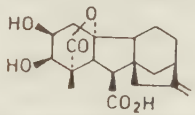
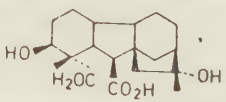
Substanz		Kreuzreaktion (%)				
Strukturformel	Name	GA_1-RIA	GA_3-RIA	GA_9-RIA	GA_3-EIA	GA_4-EIA
	GA_{20}	55	22	<0.1	22	1.5
	GA_{24}	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	GA_{32}	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	3.5
	GA_{34}	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	1.8
	GA_{42}	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	GA_{19}	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1

Tabelle 8 (d) : Kreuzreaktionen

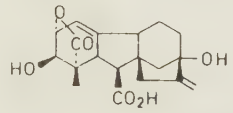
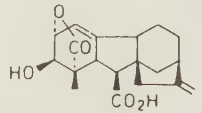
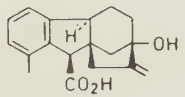
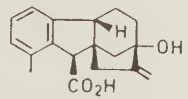
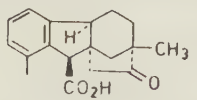
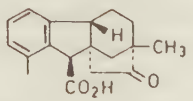
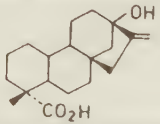
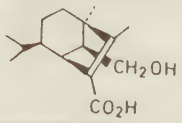
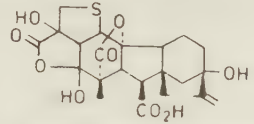
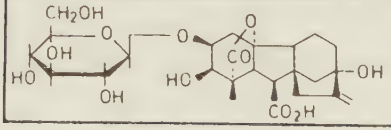
Substanz		Kreuzreaktion (%)				
Strukturformel	Name	GA_1-RIA	GA_3-RIA	GA_9-RIA	GA_3-EIA	GA_4-EIA
	iso-GA_3	10	<0.1	<0.1	<0.1	0.2
	iso-GA_7	3	<0.1	<0.1	<0.1	11
	allo-Gibberinsäure	0.1	0.1	-	<0.1	0-1
	epiallo-Gibberinsäure	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	Gibberinsäure	<0-1	<0.1	-	<0.1	<0.1

Tabelle 8 (e) : Kreuzreaktionen

Substanz		Kreuzreaktion (%)				
Strukturformel	Name	GA_1-RIA	GA_3-RIA	GA_9-RIA	GA_3-EIA	GA_4-EIA
	epi-Gibberinsäure	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	Steviol	0	0	0	0	0
	Helminthosporsäure	o	0	0	0	0
	Gibberethion	0	0	0	0	0
	GA_8-Glucosid	0.1	<0.1	-	<0.1	<0.1

4.2. Ausarbeitung spezifischer Analysemethoden für die Immuntests und deren Genauigkeit und Reproduzierbarkeit

Kriterien für Präzision und Reproduzierbarkeit von Radio- und Enzymimmuntests sind z.B. geringe Standardabweichungen von den Mittelwerten der Triplettbestimmungen bekannter oder unbekannter Probenmengen im Test. Weiterhin sollten der Meßbereich bzw. der 50 % B/B_o-Wert eines Tests bei allen Bestimmungen immer in den gleichen Größenordnungen liegen. In der folgenden Tabelle sind für eine größere Anzahl von Bestimmungen für die einzelnen Tests die Variationskoeffizienten von Triplettbestimmungen und die durchschnittlichen Werte von B/B_o = 50 % mit Standardabweichungen aufgeführt:

Tabelle 9: Parameter, die die Präzision und Reproduzierbarkeit der aufgestellten Immuntests dokumentieren.

Testsystem	GA_1-RIA	GA_3-RIA	GA_3-EIA	GA_4-EIA	GA_9-RIA
Zahl der Bestimmungen	87	55	18	15	11
Variationskoeffizienten von Triplettbestimmungen	4.4	4.6	5.4	5.8	4.5
B/B_o = 50 % mit Standardabweichungen (RIA: pMol; EIA: fMol)	0.5 $\pm$0.18	1.2 $\pm$0.27	0.8 $\pm$0.20	26 $\pm$12.8	13 $\pm$8.5

Es ist zu sehen, daß die Genauigkeit der RIA-Bestimmungen etwas größer ist als die der EIAs. Die Variationskoeffizienten von ca. 5 % bei den Triplettbestimmungen und die gut reproduzierbaren Meßbereiche gewährleisten hinreichend exakte Bestimmungen.

Eine weitere Voraussetzung der präzisen Analyse von Gibberellinen in Pflanzenextrakten ist die Linearität der Meßergebnisse in einer entsprechenden Verdünnungsreihe. Dazu werden z.B. die erhaltenen Werte in der logit B/B_0 Form gegen die Konzentrationen der Extrakte aufgetragen und mit der entsprechenden linearisierten Standardkurve verglichen. Beide Kurven müssen parallel verlaufen. Da in den Tests die Methylester der Gibberelline als Standards eingesetzt wurden, mußten die Extrakte ebenfalls methyliert werden. Ansonsten wäre es wegen Affinitätsunterschieden von Standard und zu messender Probe zu einer Unterbestimmung der als freie Säuren im unmethylierten Extrakt vorliegenden Gibberelline gekommen. Zur Kontrolle, ob die Behandlung mit Diazomethan nicht zu einer Zerstörung immunreaktiven Materials in den Extrakten führt, wurde vor der Methylierung einigen Proben eine definierte Menge unmethylierten Gibberellinstandards zugesetzt. Verdünnungsreihen dieser Extrakte wurden ebenfalls in den betreffenden Immuntests bestimmt. Auch diese Kurven verlaufen parallel zur Standardkurve; die berechneten Wiederfinderaten liegen zwischen 89 % und 95 % der eingesetzten internen Standards (s. Abbildung 15).

Wegen der geringen Gibberellingehalte in dem untersuchten Pflanzenmaterial (s. Kapitel III.5.) konnte keine andere physikalisch-chemische Methode zur Überprüfung der Analysewerte herangezogen werden. Es bot sich lediglich für GA_3 ein Vergleich zwischen dem Radioimmuntest und dem Enzymimmuntest an. Abbildung 16 zeigt die Korrelation von GA_3-Bestimmungen in Gerstenextrakten mit Hilfe der beiden Immuntests.

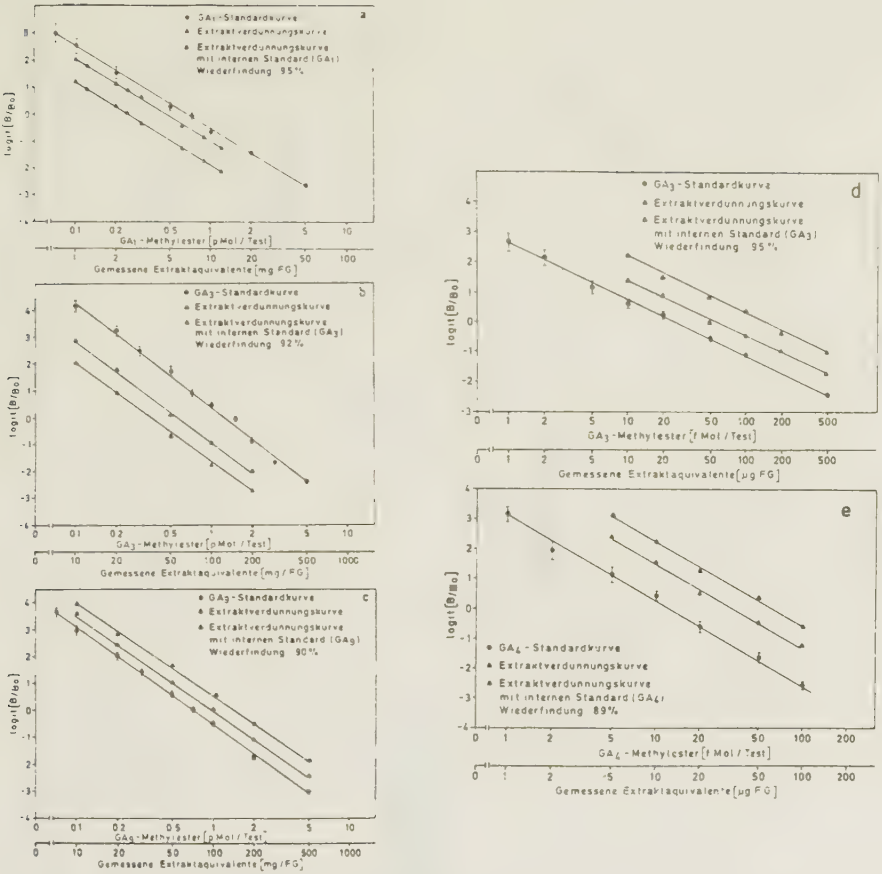


Abbildung 15: Standardkurven für die Immuntests von GA_1, GA_3, GA_4 und GA_9 mit Verdünnungsreihen der Äthylacetatfraktionen von Extrakten aus Gerstenkaryopsen, jeweils mit (Δ) und ohne (▲) internen Standard. a GA_1-RIA, b GA_3-RIA, c GA_9-RIA, d GA_3-EIA, e GA_4-EIA.

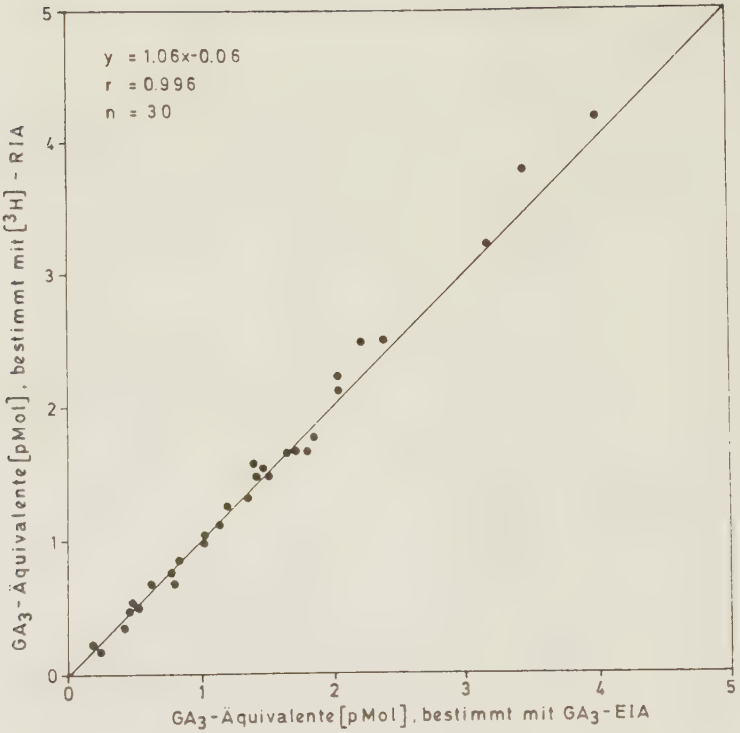


Abbildung 16: Korrelation zwischen GA_3-RIA und GA_3-EIA. Die Bestimmungen erfolgten in Äthylacetatfraktionen der Rohextrakte von Gerstenkaryopsen.

Die hohen Kreuzreaktionen der Antiseren mit verschiedenen Gibberellinen gewährleisten in fast allen Immuntests keine spezifische Bestimmung eines Gibberellins in Rohextrakten. Eine Ausnahme bildet der GA_9-RIA. Dies ist auch in Abbildung 17 zu sehen, welche die Verteilung immunreaktiver Substanzen in den eluierten Fraktionen der Dünnschichtchromatogramme von Extrakten zeigt (zum Trennverfahren vgl. Kapitel II.5.3.3.). Mit Hilfe dieser Reinigungsmethode ist es möglich, GA_{1+3}, GA_4, GA_7 und GA_9 sauber zu trennen.

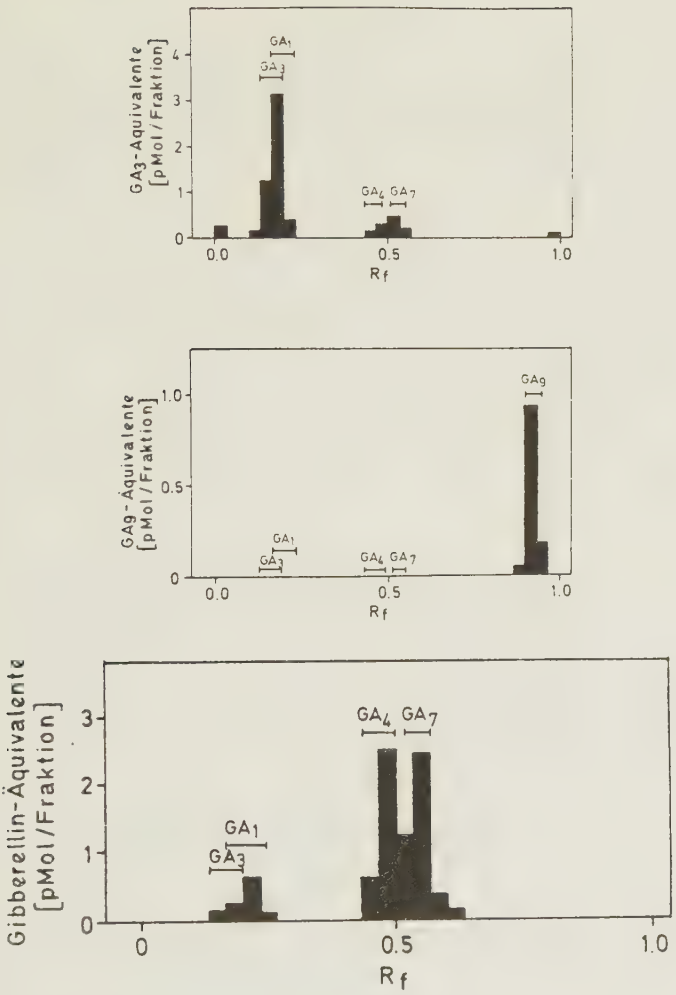


Abbildung 17: Verteilung von immunreaktivem Material auf Dünnschichtchromatogrammen verschiedener Pflanzenextrakte, analysiert mit drei Immuntests.
a GA_3-RIA, b GA_9-RIA, c GA_1-RIA. Aliquots der Äthylacetatphasen von Rohextrakten aus Gerstenkaryopsen.

Eine Separierung von GA_1 und GA_3 in dem benutzten Laufmittel ist nicht möglich. Eine selektive Bestimmung der beiden Gibberelline ist aber mit der Kombination zweier Immuntests realisierbar:

GA_1 hat im GA_3-RIA eine Kreuzreaktion von 11 %, GA_3 dagegen 70 % Kreuzreaktion im GA_1-RIA. Nach Messung der GA_{1+3}-Fraktion eines Chromatogramms ergeben z.B.: y Mol GA_1 + x · 0.7 Mol GA_3 = n Mol GA_{1+3} im GA_1-RIA; bzw. y · 0.1 Mol GA_1 + x Mol GA_3 = m Mol GA_{1+3} im GA_3- RIA. m und n sind bekannt, so daß durch Lösung einer Gleichung mit zwei Unbekannten der Anteil von GA_1 und GA_3 im Gemisch ermittelt werden kann.

Tabelle 1o zeigt die Ergebnisse einer Reihe von Bestimmungen (n = 15) aus chromatographierten Gemischen definierter Mengen von GA_1 und GA_3. Die nahezu gleichen Wiederfindungsraten (82 bzw. 83 %) für beide Gibberelline bei guter Reproduzierbarkeit zeigen, daß die entwickelte Methode hinreichend selektive Bestimmungen ermöglicht. Anstelle des GA_3-RIA kann auch der GA_3-EIA eingesetzt werden.

Tabelle 10: Chromatographie und Analyse von Gemischen aus GA_1 und GA_3 bekannter Zusammensetzung zur Bestimmung der Wiederfinderaten.

Menge eingesetzter GA [pMol]		Wiederfindung [%] nach Chromatographie; mit Standardabweichungen (n = 15).	
GA_1	GA_3	GA_1	GA_3
100	100	82 ± 2.9	83 ± 3.0

Die GA_4-Fraktionen können mit Hilfe des GA_1-RIA unter Einrechnung der Kreuzreaktion von 40 % bestimmt werden, aber auch mit Hilfe des GA_4-EIA. Wie Abbildung 18 zeigt, stimmen die Werte der beiden Tests gut überein, der Korrelationskoeffizient liegt bei 0.949 für 30 vorgenommene Bestimmungen.

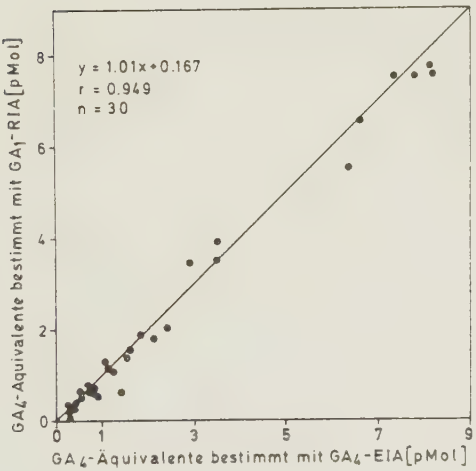
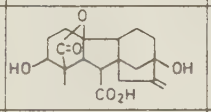
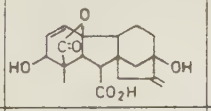
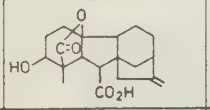
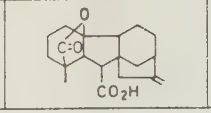


Abbildung 18: Korrelation von GA_1-RIA und GA_4-EIA für die Bestimmung von GA_4 unter Berücksichtigung von 40 % KR im RIA.

Auf die gleiche Weise können auch die GA_7-Fraktionen quantifiziert werden (KR im GA_1-RIA: 70 %; KR im GA_4-EIA: 80 %). Ebenfalls Bestimmungen sind für GA_{20} und GA_5 möglich. Beide Substanzen sind zwar nicht sauber von GA_4 bzw. GA_7 trennbar (R_f-Werte im verwendeten Laufmittel s. Kapitel II.5.3.3.) und weisen mit dem GA_1-Antiserum hohe Kreuzreaktionen auf (55 bzw. 29 %), nicht jedoch mit den $GA_{4/7}$-Antikörpern (1.5 bzw. 0.1 %). Sollten die GA_4- oder GA_7-Fraktionen GA_{20} und GA_5 in größeren Mengen enthalten, müßte sich dies in schlechten Korrelationen der Meßwerte beider Tests niederschlagen. Eine Korrektur der Ergebnisse könnte dann wie für GA_1 und GA_3 beschrieben vorgenommen werden. Die Anwendung der Tests (s. Kapitel III.5.) ergab aber keine Hinweise auf hohes Vorkommen von GA_5 oder GA_{20} im analysierten Pflanzenmaterial.

Mit Hilfe dünnschichtchromatographischer Reinigung von Gibberellinen aus Rohextrakten und dem kombinierten Einsatz von Immuntests unterschiedlicher Spezifität ist es also möglich, GA_1, GA_4, GA_7 und GA_9 selektiv zu messen. Ob die Methode auch für GA_5 und GA_{20} hinreichend präzise ist, kann nicht mit Sicherheit belegt werden, weil sowohl ausreichende Substanzmengen für Vorversuche als auch geeignete Anwendungen in Pflanzen fehlten. Zum Abschluß dieses Kapitels werden einige wichtige Parameter der Radio- und Enzymimmuntests noch einmal in Tabelle 11 zusammengefaßt:

Tabelle 11 : Parameter der entwickelten Radio- und Enzymimmuntests.

		Test-system	Meßbereich [f Mol]	Nachweisgrenze [f Mol]	[p g]	K_a [l/Mol]	Variationskoeffizienten von Triplettbestimmungen
GA_1		RIA	70-5000	70	24	$2.3 \cdot 10^{10}$	4 4
GA_3		RIA	100-5000	100	35	$1.7 \cdot 10^{10}$	4.6
		EIA	1-500	0 5	0 2	$5.2 \cdot 10^{10}$	5 4
GA_4		EIA	2-2000	2	0 66	$4.95 \ 10^{10}$	5.8
GA_9		RIA	100 · 5000	100	32	$1.85 \cdot 10^{10}$	4.5

5. Untersuchungen zum Hormonhaushalt keimender Gerstenkaryopsen

Die für Gibberelline entwickelten Immuntests (Kapitel III.2.-4.) sind aufgrund ihrer hohen Nachweisempfindlichkeiten, ihrer Spezifität und Genauigkeit geeignet für die Analyse von Pflanzenextrakten. Zusammen mit den Radio- und Enzymimmuntests für Cytokinine, IES und ABA sollten sie bei Untersuchungen des Hormonhaushaltes keimender Gerstenkaryopsen ihre Anwendung finden.

5.1. Vergleichende Untersuchungen des Gibberellingehaltes und der Aktivität der α-Amylase

HABERLAND (1890) fand, daß zur Stärkehydrolyse im Endosperm von Gerstenkaryopsen der Embryo notwendig ist. Ferner ist bekannt (PALEG, 1960; YOMO, 1960), daß nach Inkubation von embryolosen Karyopsen in gibberellinsäurehaltiger Lösung eine wesentlich höhere Aktivität der α-Amylase meßbar ist als in Präparaten, die nicht mit dem Hormon behandelt wurden. Gibberellin kann also in solchen Experimenten die Funktion des Embryos bei der Enzymaktivierung ersetzen. Biotestmessungen ergaben Gibberellinaktivität im Embryo (PALEG, 1960; YOMO ,1960 ; McLEOD und PALMER, 1966). Daraus wurde geschlossen, daß GA_3 oder ein anderes Gibberellin die induktive Substanz im Embryo sei. GROAT und BRIGGS (1969) fanden im Endosperm von Gerstenkaryopsen wenige Stunden vor Anstieg der Aktivität der α-Amylase ein Maximum der Gibberellinaktivität mit Hilfe von Biotestbestimmungen. Diese Erkenntnisse führten zu der Theorie, daß im frühen Stadium der Keimung Gibberellin im Embryo der Gerstenkaryopse syn-

thetisiert wird, ins Endosperm diffundiert und dort die Synthese der α-Amylase bewirkt (YOMO und VARNER, 1971; BRIGGS, 1973). Induktionsort soll die Aleuronschicht sein, denn Experimente mit isolierten Aleuronschichten zeigten, daß sie nach Gibberellinbehandlung eine stark erhöhte α-Amylaseaktivität besaßen (CHRISPEELS und VARNER, 1967a). Es wurde eine de novo Synthese des Enzyms unter diesen Bedingungen nachgewiesen (FILNER und VARNER, 1967). Widersprüchliche Meinungen gibt es darüber, welches Gibberellin, ob GA_3 (COHEN und PALEG, 1967; GROAT und BRIGGS, 1969) oder GA_1 (RADLEY, 1967) endogen wirksam ist.

Abbildung 19: Drei Tage gekeimte Karyopse von Hordeum vulgare L. cv. Himalaya, Erntejahr 1982. Saatgut aus Anbau im Botanischen Garten der Ruhruniversität Bochum. Keimungstemperatur: 14,4°C.

Exakte quantitative Gibberellinbestimmungen, welche die geschilderte Theorie belegen könnten, sind bisher nicht publiziert. Welche Gibberelline in keimenden Gerstenkaryopsen vorkommen, wo und in welchen Mengen sie lokalisiert sind und wie sich ihre Gehalte im Verlauf der Keimung verändern sollte deshalb mit Hilfe der entwickelten Immuntests untersucht werden. Die Analyse der endogen vorkommenden Gibberelline in Keimungskinetiken sollte es erlauben, einen möglichen Einfluß auf die Induktion der α-Amylase zu erkennen und so die Voraussetzung für weitergehende Experimente zu schaffen.

Als Versuchsobjekte dienten Gerstenkaryopsen unterschiedlichen Alters und Herkunft (Kapitel II.5.1.). Nach unterschiedlicher Keimdauer wurden nach Aufarbeitung die Aktivität der α-Amylase und die Phytohormongehalte wie beschrieben (Kapitel II.5.2.-3.) bestimmt. Auf den Ergebnissen dieser Experimente (Kapitel III.5.1.2.) aufbauend folgten Untersuchungen zur Induzierbarkeit der α-Amylase in embroyolosen Karyopsen und isolierten Aleuronschichten (Kapitel III.5.1.3.).

5.1.1. Wahl geeigneter Versuchsbedingungen

Vor der eigentlichen Anwendung sollten in Vorversuchen geeignete Bedingungen für die Keimung gefunden werden, die Präparate auf Sterilität kontrolliert werden sowie ein effizientes Verfahren zur Extraktion der Phytohormone ohne große Aufarbeitungsverluste ausgearbeitet werden.

GROAT und BRIGGS (1969) führten die meisten ihrer kinetischen Untersuchungen mit Gerstenkaryopsen bei 14.4°C und limitierter Wasserzufuhr durch. Diese Bedingungen sind von

dem Mälzen in der Brauindustrie bekannt (vgl. KIRSOP und POLLOCK, 1958). Die Körner werden zwei Tage unter Wasser gesetzt, anschließend trocken ausgelegt und bei 14.4°C inkubiert. Der Vorgang garantiert ein kontinuierliches Ansteigen der α-Amylaseaktivität, die dann längere Zeit konstant bleibt, verhindert aber gleichzeitig die Keimung. Für die Keimungskinetiken wurde zwar die gleiche Temperatur von 14.4°C, aber sonst möglichst natürliche Bedingungen, d.h. mit ausreichender Wasserzufuhr, gewählt. Die niedrige Keimungstemperatur führte zu größerer morphologischer Uniformität der Karyopsen als bei 25°C.

Das Auslegen der Gerstenkörner, die Keimung und die vorgenommenen Präparationen (Kapitel II.5.2.) mußten unter sterilen Bedingungen erfolgen. Es ist nämlich nicht auszuschließen, daß Mikroorganismen in der Lage sind, Gibberelline zu produzieren, und so die Analysewerte verfälschen. Zur Kontrolle wurden Karyopsen ganz oder in Scheiben geschnitten, um auch eventuell vorkommende subepidermale Pilze zu sehen, auf Kartoffel-Glucose-Agar ausgelegt. Nach neun Tagen bei 14.4°C, also mindestens zwei Tage mehr als die längsten durchgeführten Keimungskinetiken, konnten keine Mikroorganismen auf den Agarplatten identifiziert werden (Abbildung 20). Dieses Resultat deutete darauf hin, daß auch bei der Keimung auf feuchtem Filterpapier in Petrischalen hinreichend sterile Bedingungen gewährleistet waren.

Bei der Extraktion der Wuchsstoffe aus dem Pflanzenmaterial mußte die Effizienz des Verfahrens überprüft werden. Dazu wurden die mechanisch zerkleinerten gekeimten Körner (Alter: 2 Tage) bis zu 48 Stunden in 80 % Methanol extrahiert (Kapitel II.5.3.1.) und in bestimmten Zeitabständen Bestimmungen von GA_1 und GA_3 durchgeführt. Es wurde gefunden (Tabelle 19), daß zwischen 24 und 48 Stunden nur noch geringe Mengen Gibberellin aus dem Pflanzenmaterial freigesetzt wurden.

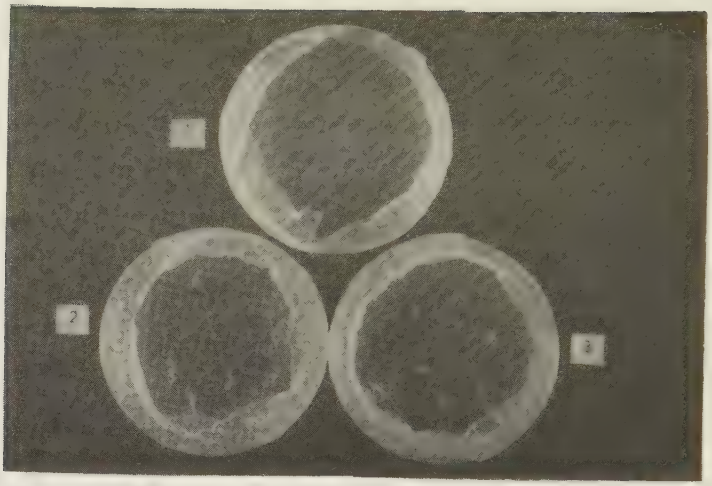


Abbildung 20: 9 Tage auf Kartoffel-Glucose-Agar gekeimte Gerstenkaryopsen.
1 = Kontrolle, 2 = Karyopsen, 3 = zerteilte Karyopsen. Ein Wachstum von Mikroorganismen war nicht festzustellen.

Nach drei Stunden waren die beiden Hormone zu ca. 85 % des Wertes nach 48 Stunden extrahiert. Diese Extraktionszeit wurde in allen folgenden Versuchen beibehalten.

Um Kenntnis über Verluste bei der Aufarbeitung der Präparate zu erhalten, wurde nach mechanischer Zerkleinerung der Pflanzenmaterials [1,2-^{3}H]-GA_1 oder [1,2-^{3}H]-GA_4 den Extraktionsmedien als interne Standards zugegeben und nach Methylierung entweder äthylacetatausgeschüttelter Rohextrakte oder chromatographierter Fraktionen (s. Kapitel II.5.3.) die absoluten Radioaktivitäten bestimmt. Die Wiederfinderaten lagen zwischen 80 und 90 %. Nach dünnschichtchromatographischer Kontrolle war jeweils nur eine radioaktive Bande mit dem gleichen R_f-Wert wie die entsprechende Referenz zu identifizieren. Die Aufarbeitungsverluste waren also gering. Alle

Analysewerte wurden um die gemessene Wiederfinderate korrigiert.

Tabelle 19: Innerhalb 48 Stunden extrahierbare GA_1 und GA_3 aus 20 gekeimten (2 Tage) Karyopsen. (100 % = 48 Stunden).

Dauer der Extraktion [h]	Extrahiertes Gibberellin			
	GA_1		GA_3	
	[pMol]	[%]	[pMol]	[%]
1	8.7	61	3.5	59
2	1o.7	75	4.3	73
3	11.9	84	5.0	85
4	12.5	88	5.3	89
5	12.8	90	5.4	91
6	13.2	93	5.5	93
8	13.2	93	5.6	95
12	13.5	95	5.6	95
24	13.9	98	5.7	97
48	14.2	100	5.9	100

5.1.2. Kinetik der Aktivität der α-Amylase und des Phytohormonspiegels verschiedener Gerstenvarietäten

5.1.2.1. Hordeum vulgare L.cv.Himalaya (Bochum 1978)

Die ersten Keimungskinetiken wurden mit Pflanzenmaterial durchgeführt, das auf Versuchsfeldern des Botanischen Gartens der Ruhruniversität Bochum im Jahre 1978 angezogen und geerntet worden war; das Saatgut stammte aus Pullman, USA, Erntejahr 1973. Unter den Bedingungen des Freilandanbaus

konnte eine Fremdbestäubung nicht ausgeschlossen werden. Die geernteten Karyopsen waren morphologisch sehr unterschiedlich, daher mußte eine sorgfältige Auswahl des Versuchsmaterials vorgenommen werden. Die zur Keimung ausgelegten Karyopsen entwickelten sich allerdings sehr einheitlich.

Ungekeimte Körner wiesen eine geringe α-Amylaseaktivität (ca. 1U/Korn) auf, die nach 30 Stunden anstieg und bei 60 Stunden das 35fache ihres Ausgangswertes erreicht hatte (Abbildung 21).

Bei den analysierten Phytohormonen war der Gehalt der GA_4 im Korn der stärksten Veränderung unterworfen, wie Abbildung 21 zeigt: Nach 48 Stunden ist mit 9.3 pMol im Korn ein Maximum erreicht, das etwa zwölf Stunden vor dem der α-Amylase auftritt. Anstieg und Abfall dieses Gipfels vollziehen sich innerhalb von 24 Stunden; eine zehnfache Steigerung ist gegenüber dem Wert im ruhenden Korn zu registrieren. Diese Befunde können auf einen ursächlichen Zusammenhang zwischen Gibberellingehalt und Enzymaktivität hindeuten, wie schon in der Einleitung von Kapitel 5.1. erwähnt. Wie Abbildung 21 weiter zeigt, können solche Vermutungen nicht für die anderen gemessenen Gibberelline angestellt werden. Keine Veränderungen der Meßwerte in Karyopsen ist für IES zu erkennen, ähnliche Resultate ergaben immunologische Bestimmungen für Cytokinine (IPA: ca. 0.15 pMol/Korn; Zeatin: ca. 0.1 pMol/Korn) oder für GA_9 (ca. 0.08 pMol/Korn).

Die in Abbildung 21 gleichfalls dargestellten Ergebnisse von ABA-Messungen werden in einem späteren Kapitel (III. 5.2.) zusammen mit anderen Versuchsobjekten gesondert diskutiert werden; und auch die weiteren Untersuchungen in diesem und den folgenden Kapiteln sollen sich auf die Analyse von Gibberellinen und die Bestimmung der Aktivität der α-Amylase beschränken.

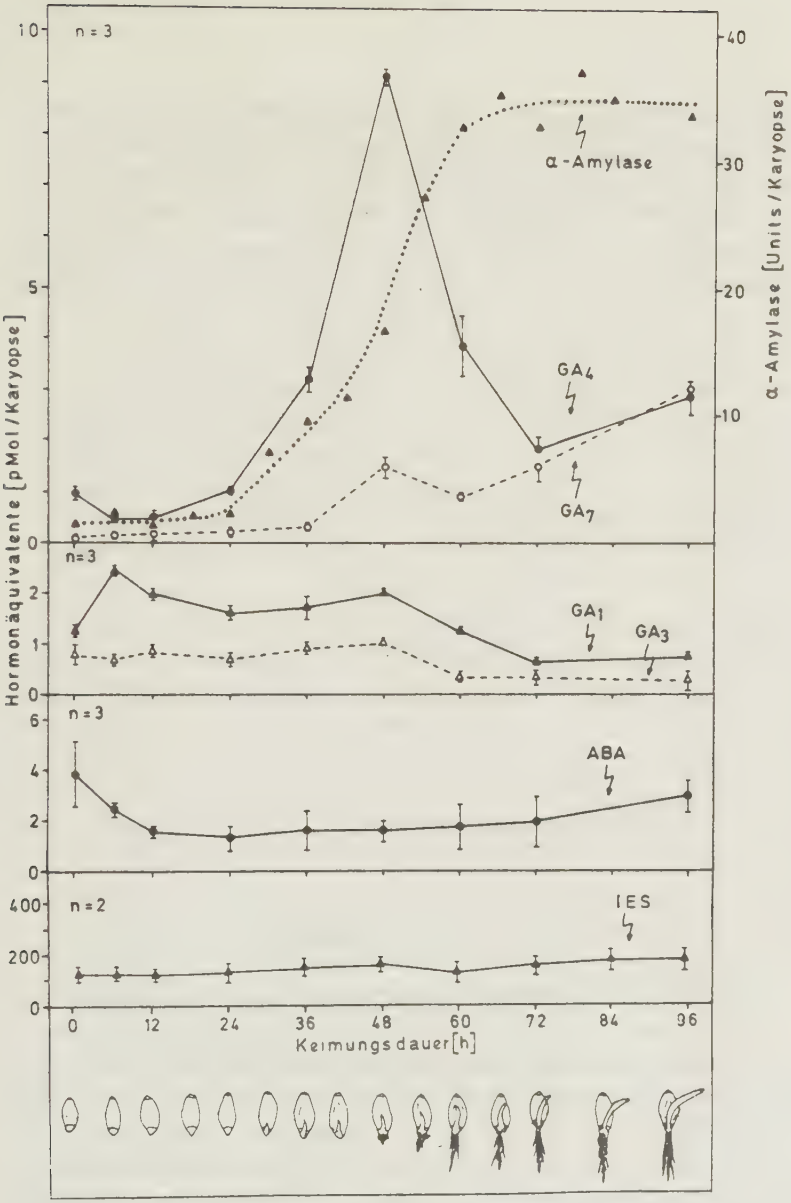


Abbildung 21: Veränderung von Phytohormongehalt und α-Amylaseaktivität in keimenden Gerstenkaryopsen. Objekt: Hordeum vulgare L.cv. Himalaya (Ernte Bochum /1978). n = Anzahl der durchgeführten Bestimmungen, mit Standardabweichungen.

In der Literatur gibt es für diese Werte kaum Vergleichsmöglichkeiten ; lediglich GROAT und BRIGGS (1969) führten wie schon erwähnt ähnliche Kinetiken durch und bestimmten mit Hilfe von Biotests die Gibberellinaktivität in verschiedenen Entwicklungsstadien der Karyopsen. Der dabei gefundene maximale Gibberellingehalt betrug 0.8 ng/Karyopse, was etwa 2.5 pMol sind.

Das im dargestellten Versuchsobjekt mengenmäßig dominante Gibberellin war aber GA_4, während aufgrund des chromatographischen Verhaltens die genannten Autoren nur GA_1 oder GA_3 identifiziert haben konnten, worüber Biotestdaten allerdings keinen genauen Aufschluß geben können, weil die Spezifität des Meßverfahrens nicht ausreichend ist.

Nachdem die Untersuchungen im ganzen Korn ergeben hatten, daß wenige Stunden vor Anstieg der α-Amylaseaktivität maximale Konzentrationen GA_4 identifizierbar waren, war es nur folgerichtig, zu klären, in welchen Teilen der Karyopse das Enzym aktiv ist und wo die Gibberelline, vor allem GA_4 lokalisiert sind. Es wurde daher der Embryo gekeimter Gerstenkaryopsen vom Endosperm getrennt und separate Analysen vorgenommen.

Dabei ergab sich, daß in jedem untersuchten Keimungsstadium mindestens 95 % der gesamten Enzymaktivität im Endosperm zu finden waren. Für die Gibberelline wurde folgendes Verteilungsmuster gefunden (s. Abbildung 22): Über 80 % der im ganzen Korn identifizierten GA_4 sind zum Zeitpunkt des maximalen Vorkommens im Endosperm lokalisiert. In ungekeimten Körnern ist der GA_4-Gehalt in Embryo und Endosperm nahezu gleich; dagegen finden sich 75 % der GA_1 unmittelbar nach Beginn der Quellung im Embryo. Für die anderen gemessenen Gibberelline, nämlich GA_3 und GA_7, wurden zu Zeitpunkten, an denen die Induktion der α-Amylase möglich ist, etwa gleiche Mengen in Embryo und Endosperm analysiert. Falls

Gibberelline einen direkten Einfluß auf die Regulation der α-Amylase besitzen, so sollten sie kurz vor dem Anstieg der Enzymaktivität schwerpunktmäßig am Induktionsort lokalisiert sein, wie dies im Falle der GA_4 zuzutreffen scheint.

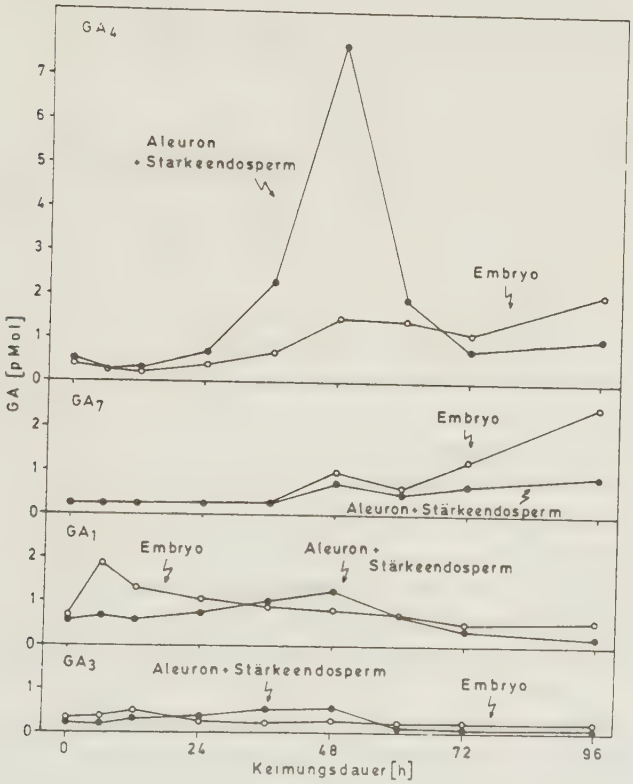


Abbildung 22: Hordeum vulgare L.cv.Himalaya (Ernte Bochum 1978). Gibberellinverteilung in Embryo und Endosperm.

Bei Varietäten von Gerste, deren α-Amylaseaktivität vorwiegend im Endosperm zu finden ist, zeigten Befunde, daß Induktions- und Syntheseort des Enzyms die Aleuronschicht ist (CHRISPEELS und VARNER,1967a; FILNER und VARNER, 1967). Die unter diesen Bedingungen notwendige lag-Phase zur Induktion nach mRNA- und Proteinsynthese beträgt nach Meinung der meisten Autoren (vgl. TOMOS und LAIDMAN, 1979; JACOBSEN und HIGGINS, 1982) maximal 20 Stunden. Vermehrtes Vorkommen von GA_4 in der Aleuronschicht der untersuchten Gerste in dieser Zeitspanne könnte also bedeuten, daß dieses Hormon der Induktor ist.

Noch ein weiterer Gesichtspunkt zeigt die Notwendigkeit von separaten GA-Analysen in Aleuronschichten und Stärkeendosperm zusätzlich zu Bestimmungen im Embryo: Um nachzuprüfen, ob die in Einleitung und in Kapitel 5.1. geschilderte Theorie einer Diffusion der GA im Syntheseort (Embryo) zum Induktionsort (Aleuronschicht), die in der Physiologie pflanzlicher Hormone die herrschende Lehrmeinung bildet (vgl. YOMO und VARNER, 1971), stichhaltig ist, sollten die erhaltenen Meßwerte zur Feststellung entsprechender Konzentrationsgradienten auf die Frischgewichte bezogen werden.

Es wurden deshalb zu verschiedenen Zeitpunkten der Keimung Karyopsen in Embryo (+ Scutellum), Aleuronschicht und Stärkeendosperm getrennt. Saubere Präparationen von Aleuronschichten gelangen nur mit Karyopsen, die lange genug gequollen waren, was für die zu untersuchenden Keimungsstadien nach 36,48 und 60 Stunden gewährleistet war.

Tabelle 20 zeigt für GA_4 die Konzentrationen, bezogen auf mg Frischgewicht, und die prozentualen Gehalte des Hormons in den präparierten Teilen. Nach 48 Stunden Keimung sind 60 % der identifizierten GA_4 am Induktionsort lokalisiert.

Weiterhin ist zu erkennen, daß der Konzentrationsgradient zwischen Embryo und Endosperm zu allen gemessenen Zeitpunkten die Diffusionshypothese nicht widerlegt. Die Daten sprechen allerdings auch nicht gegen eine GA_4-Synthese in der Aleuronschicht, so daß die Fragestellung offen bleibt.

Tabelle 20: Prozentuale Verteilung und Konzentration von GA_4 in Embryo (Em), Stärkeendosperm (SE) und Aleuronschicht (Al) von Hordeum vulgare L.cv. Himalaya, Bochum 1978.

Keimungsdauer [h]	Verteilung [%]			Konzentration [pMol/mg FG]		
	Em	SE	AL	Em	SE	Al
36	22	29	49	0.14	0.05	0.14
48	16	24	60	0.22	0.10	0.41
60	41	18	41	0.17	0.04	0.14

5.1.2.2. Hordeum vulgare L.cv.Himalaya (Bochum 1982)

Die zweite von Hordeum vulgare L.cv.Himalaya zu Keimungskinetiken und Hormonbestimmungen verwendete Varietät wurde ebenfalls im Botanischen Garten der Ruhruniversität Bochum angezogen und geerntet, allerdings 1982. Das Saatgut bildeten Karyopsen der 1978 angebauten Himalayagerste.

Wie beschrieben wurden Karyopsen unter sterilen Bedingungen zur Keimung ausgelegt und entwickelten sich morphologisch ähnlich einheitlich wie das in 5.1.2.1. untersuchte Pflanzenmaterial.

Wie Abbildung 23 zeigt, war ein Maximum der α-Amylaseaktivität erst nach ca. 110 Stunden meßbar. Gegenüber der zuerst verwendeten Varietät war das eine zeitliche Verzögerung von

mehr als 48 Stunden. Von den Hormonen wurden nur die Gibberelline, mit Ausnahme von GA_9, und ABA (s. dazu Kapitel III. 5.2.) mit dem Immuntest bestimmt. Die Werte für GA_7 bewegten sich am Rand der Nachweisgrenze (ca. 0.05 pMol/Korn), kaum höhere Gehalte ergaben die Bestimmungen von GA_3 (ca. 0.1 pMol/Korn) und GA_4 (ca. 0.15 pMol/Korn), während GA_1 maximal 7.4 pMol/Korn erreichte. Dieser Gipfel trat nach 96 Stunden, also etwas mehr als 12 Stunden vor dem Maximum der gemessenen Enzymaktivität auf (Abbildung 23). Die zeitliche Relation zwischen erhöhten GA-Gehalten und dem Anstieg der Enzymaktivität stimmte also mit dem ersten Versuchsobjekt überein; gleichfalls die Größenordnungen der Analysewerte, die Zeitpunkte der Maxima lagen jedoch später. Außerdem dominiert in dieser Gerstenvarietät von der Quantität her nicht GA_4, sondern GA_1. Gemeinsam ist beiden Varietäten der kurze und geringe Anstieg der GA_1 sechs Stunden nach Beginn der Keimung. Die Daten zeigen, daß nicht nur ein einziges Gibberellin bei der Regulation der Enzymaktivität eine Funktion zu haben scheint, obwohl die Varietäten nahe verwandt sind.

Bestimmungen in Embryo und Endosperm der Keimungsstadien ergaben, daß zu allen untersuchten Zeitpunkten mehr als 95 % der α-Amylase im Endosperm aktiv waren. Die Verteilung der GA_1 (Abbildung 24) ergab nach sechs Stunden Keimung 65 % Gibberellin im Embryo, nach 96 Stunden 80 % im Endosperm. Während also im ersten Versuchsobjekt zwei Gibberelline mit möglicherweise unterschiedlichen Funktionen zu verschiedenen Zeitpunkten in Embryo und Endosperm bzw. Aleuronschicht identifiziert wurden, zeigt hier nur ein Gibberellin signifikante Veränderung in Gehalt und Verteilung.

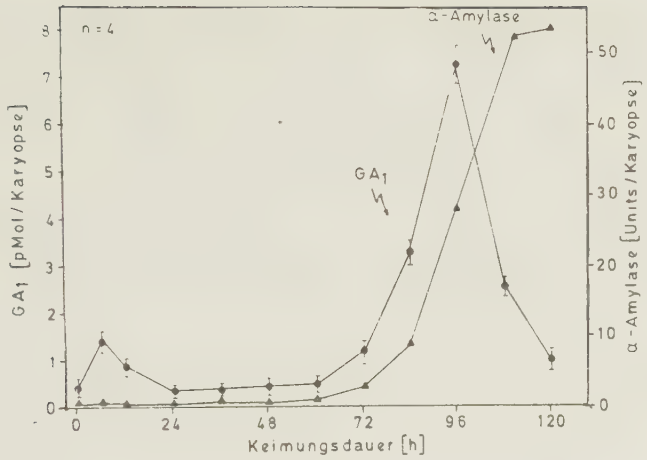


Abbildung 23: Hordeum vulgare L.cv.Himalaya, Ernte Bochum 1982. Veränderung von α-Amylaseaktivität und GA_1-Gehalt während der Keimung.
n = Anzahl der Experimente, mit Standardabweichungen.

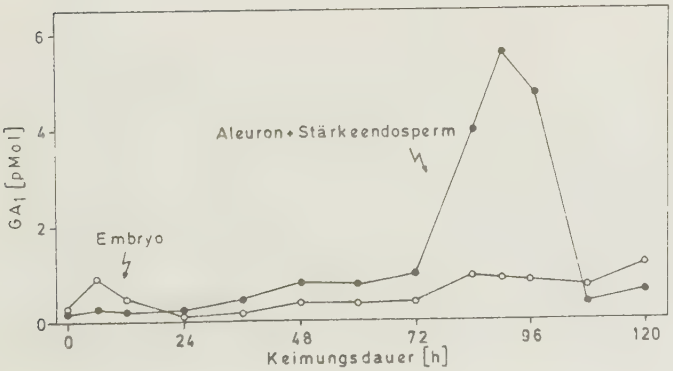


Abbildung 24: Hordeum vulgare L.cv.Himalaya, Ernte Bochum 1982. Verteilung von GA_1 in Embryo und Endosperm.

Wie Tabelle 21 ausweist, konnte nach Präparation von Aleuronschichten und GA_1-Bestimmungen der separierten Karyopsenteile für GA_1 ein ähnliches Verteilungsmuster wie für GA_4 in den von 1978 stammenden Karyopsen gefunden werden, ebenso die gleichen Konzentrationsgradienten.

Tabelle 21: Prozentuale Verteilung und Konzentration von GA_1 in Embryo (Em), Stärkeendosperm (SE) und Aleuronschicht von Hordeum vulgare L.cv. Himalaya, Bochum 1982.

Keimungsdauer	Verteilung (%)			Konzentration (pMol/mg FG)		
(h)	Em	SE	AL	EM	SE	AL
48	52	22	26	0.04	0.02	0.03
72	44	26	30	0.03	0.01	0.03
84	19	22	59	0.08	0.05	0.21
90	11	28	61	0.07	0.06	0.28
96	15	23	62	0.07	0.06	0.26
108	58	20	22	0.08	0.01	0.02
120	65	21	14	0.09	0.01	0.01

5.1.2.3. Sonstige analysierte Gerstensorten

Bei einem Teil des zu untersuchenden Materials handelte es sich um Himalayagerste: Hordeum vulgare L.cv.Himalaya stammte zum einen aus Pullman, USA (Ernste 1980), hatte also dieselbe geographische Herkunft wie das Saatgut der 1978 in Bochum angezogenen Gerste. Ebenfalls Himalayagerste, aber aus Großbritannien (Rothamsted Experimental Station), war mit Ernten von 1978, 1981 und 1982 vorrätig. Gibberellingehalt und α-Amylaseaktivität in Keimungskinetiken sollten mit den in Kapitel 5.1.2.1. gezeigten Resultaten verglichen werden.

Neben Hordeum vulgare L.cv.Himalaya gibt es einige andere Gerstenvarietäten, die häufiges Objekt von Keimungsexperimenten sind. Dazu gehört auch Hordeum vulgare L.cv.Nordal. Z.B. fand GIBBONS (1981), daß dort das Scutellum der Hauptsyntheseort der α-Amylase ist und nicht die Aleuronschicht. Der Befund gab Anlaß, nach Keimung von Material dieser Varietät (Carlsberg Plant Breeding Research Station, Dänemark, Ernte 1981) zu prüfen, ob α-Amylaseaktivität und Gibberelline in ihren Maxima in denselben Karyopsenteilen lokalisiert sind.

In zahlreichen Untersuchungen verwendete die Arbeitsgruppe von Briggs Hordeum distichon L.cv.Proctor (s. z.B. BRIGGS, 1967; GROAT und BRIGGS, 1969; MURPHY und BRIGGS, 1973). Einige Resultate führten zu der Ansicht (BRIGGS, 1973), daß das endogen wirksame Gibberellin vornehmlich GA_3 sei. Die für die Versuche verwendeten Karyopsen dieser Varietät stammten von der National Seed Development Organization, Cambridge, Großbritannien (Ernte 1978).

NICHOLLS fand 1982, daß Karyopsen von Hordeum vulgare L.cv. Clipper, erhalten aus Saatgut, das in Gewächshäusern bei hohen Temperaturen und Langtag angezogen wurde, sich in "klassischen" Induktionsversuchen (s. Einleitung) anders verhielt als Körner des gleichen bei niedriger Temperatur und Kurztag angebautem Material: Erstere benötigen nach Entfernen des Embryos und Inkubation in wäßriger Lösung kein exogenes Gibberellin zur Induktion der α-Amylase, die eine gleich hohe Aktivität besaß wie in GA_3-haltigem Medium inkubierte embryolose Karyopsen des anderen Anzuchttyps, oder entsprechendes Versuchsmaterials der gemeinsamen elterlichen Samen. Der Autor bezeichnete diese beiden unterschiedlich induzierbaren Varianten als "on"-Typ (Induktion der α-Amylase auch ohne exogene GA) und "off"-Typ (Induktion nur durch exogene GA). Er konnte nicht eindeutig klären, ob die Induktion des Enzyms beim "on"-Typ auf einem hohen

Gibberellinspiegel im Endosperm beruht. Es waren Karyopsen beider Antworttypen (Anbaugebiet Südaustralien, Ernte 1980 bzw. 1979) verfügbar. Damit sollten die Induktionsversuche wiederholt und außerdem nach Keimung untersucht werden, ob der endogene Gibberellingehalt des "on"-Typs im Endosperm zur Induktion der α-Amylase ausreichend ist.

Gibberellinbestimmungen in allen untersuchten Karyopsen ergaben, daß die Gehalte von GA_3, GA_4 und GA_7 sich an der unteren Nachweisgrenze des betreffenden Immuntests bewegten.

Bei den analysierten Himalayagersten (Abbildung 25) zeigte die Aktivität der α-Amylase einen qualitativ ähnlichen Verlauf: Ausgehend von ca. 2 U im ruhenden Korn wird ein Aktivitätsmaximum nach etwa 120 Stunden erreicht. Mehr als 95 % der Aktivität sind zu allen gemessenen Zeitpunkten im Endosperm zu finden. Wenige Stunden vor Erreichen der maximalen Enzymaktivität ist bei den in England angebauten Karyopsen ein Gipfel des GA_1-Gehaltes mit durchschnittlich 3 pMol pro Korn zu erkennen. Zu diesem Zeitpunkt sind mehr als 60 % GA_1 in der Aleuronschicht lokalisiert. Die Resultate der Keimungskinetik sind also mit denen des 1982 in Bochum angebauten untersuchten Materials qualitativ gut vergleichbar (Kapitel III.5.1.2.2).

Im gekeimten Pflanzenmaterial aus Pullman sind dagegen geringere GA_1-Gehalte meßbar, ein Maximum ist nicht festzustellen und die Verteilung des Gibberellins in der Karyopse war nahezu gleichmäßig. Das gibt Anlaß zu der Schlußfolgerung, daß Gibberelline nicht in allen Gerstenvarietäten zur Induktion der α-Amylase notwendig sind.

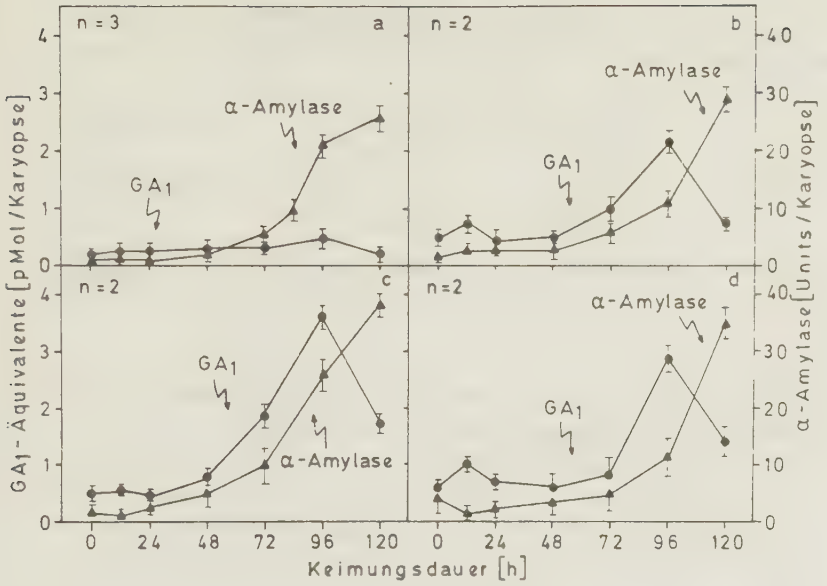


Abbildung 25: GA_1 und α-Amylaseaktivität in Hordeum vulgare L.cv.Himalaya. a) Saatgut aus USA (1980), b - d) Saatgut aus England (1978, 1981, 1982). n = Anzahl der Versuche, mit Standardabweichungen.

Die Aktivität der α-Amylase in Hordeum vulgare L.cv.Nordal und Hordeum distichon L.cv.Proctor und das endogene GA_1-Muster zeigt Abbildung 26. In "Nordal" konnten entgegen den Befunden von GIBBONS (1981) in Embryo und Scutellum keine höheren Aktivitäten der α-Amylase als in den anderen untersuchten Karyopsen gemessen werden (6 % der Gesamtaktivität), dies gilt auch für "Proctor". Zum Zeitpunkt des GA_1-Maximums sind in beiden Varietäten mehr als 50 % des Hormons in der Aleuronschicht lokalisiert. In "Proctor" liegen die analysierbaren Mengen von GA_3 am Rande der Nachweisgrenze

des Immuntests. Dies stimmt nicht mit Bestimmungen von BRIGGS (1973) bzw. GROAT und BRIGGS (1969) überein. Allerdings ist es mit den dort angewendeten Biotests auch nicht möglich, GA_1 von GA_3 zu unterscheiden, im Gegensatz zu den Immuntests.

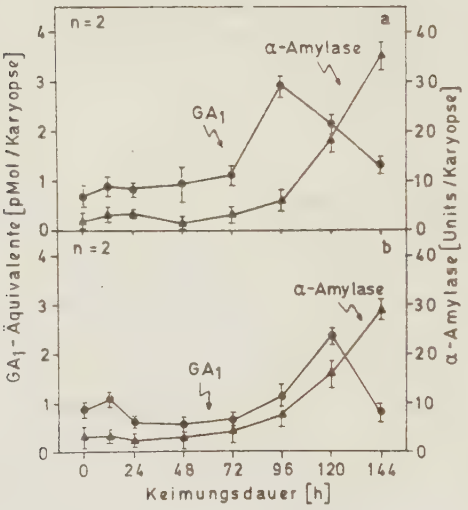


Abbildung 26: GA_1 und α-Amylaseaktivität in Hordeum vulgare L.cv.Nordal (a) und Hordeum distichon L.cv. Proctor (b). n = Anzahl der Versuche, mit Standardabweichungen.

Mit zwei Varietäten des "on"-Typs und einer des "off"-Typs von Hordeum vulgare L.cv.Clipper wurden wie beschrieben (Kapitel II.5.2.2.) embryolose Karyopsen inkubiert. Die Medien enthielten entweder 10^{-6} M Gibberellin oder nur Puffer. Wie Tabelle 22 zeigt, können die Ergebnisse von NICHOLLS (1982) bestätigt werden; die Enzymaktivität des "on"-Typs ist nach Inkubation mit und ohne Gibberellin gleichermaßen hoch.

Tabelle 22: Inkubation embryoloser Karyopsen von Hordeum vulgare L.cv.Clipper. Inkubationszeit: 48 Stunden; GA-Konzentrationen je 10^{-6}M. Pro Ansatz zwei Versuche, mit Standardabweichungen.

Behandlung	α-Amylase [U/Karyopse]		
	"on"-Typ A	"on"-Typ B	"off"-Typ
Pufferkontrolle	15.7±0.3	14.8±0.2	0.9±0.1
GA_1	16.0±0.4	14.7±0.3	15.1±0.3
GA_3	15.6±0.3	15.0±0.3	15.4±0.2

Die Keimungskinetik zeigt (Abbildung 27) für den "off"-Typ ähnliche Resultate wie bei den meisten anderen untersuchten Gerstenvarietäten: Einen maximälen GA_1-Gehalt (2.7 pMol/ Karyopse) nach 96 Stunden Keimung, die α-Amylase erreicht ein Aktivitätsplateau nach 120 Stunden. Demgegenüber setzt der Anstieg der Enzymaktivität bei den beiden "on"-Typen wesentlich früher ein (72 Stunden), was darauf hindeutet, daß die schon im ruhenden Korn gemessenen GA_1-Mengen, die sich im Verlauf der Keimung nicht verändern, zur Induktion der α-Amylase ausreichen. Jeweils mehr als 70 % der im Korn identifizierten GA_1 war nach 30 und 48 Stunden in den Aleuronschichten zu finden. Der analysierte "on"-Typ ist das einzige bisher bekannte Beispiel, daß zur Induktion der α-Amylase in Gerstenkaryopsen die Anwesenheit des Embryos nicht notwendig ist. Entgegen Ergebnissen von NICHOLLS (1982), die allerdings nicht mit quantitativen Meßverfahren gewonnen wurden, korreliert der Befund mit hohem GA_1-Vorkommen in der Aleuronschicht schon in frühen Keimungsstadien.

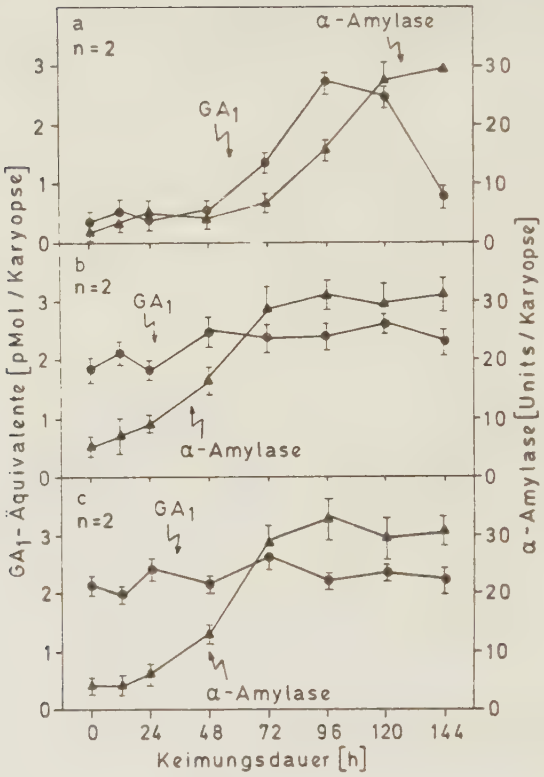


Abbildung 27: GA_1 und α-Amylase in Hordeum vulgare L.cv. Clipper. a) "off"-Typ, b) "on"-Typ A, c) "on"-Typ B. n = Anzahl der Versuche, mit Standardabweichungen.

5.1.3. Versuche mit isolierten Embryonen

Die von NICHOLLS (1982) untersuchte Gerstenvarietät ist das bisher einzige Beispiel dafür, daß zur Induktion der α-Amylase in der Aleuronschicht die Präsenz des Embryos nicht notwendig ist. Dagegen gibt es für die meisten anderen in der pflanzlichen Hormonphysiologie analysierten Gersten Belege dafür, daß während der frühen Keimungsphase der Embryo zur Enzyminduktion gebraucht wird (KIRSOP und POLLOCK, 1958; McLEOD und PALMER, 1966, 1967). Je nach Versuchsobjekt und Keimungsbedingungen liegen die Zeitpunkte, ab denen die Induktion hydrolytischer Enzyme in der Aleuronschicht ohne die Anwesenheit des Embryos ablaufen kann, zwischen 1 und 3 Tagen nach Beginn der Keimung. RADLEY (1967) sowie COHEN und PALEG (1967) fanden nach Inkubation isolierter Embryonen mit Hilfe von Biotests Gibberellinaktivität in den Präparaten, aber nach Meinung der Experimentatoren in nicht induktiven Mengen, während YOMO und IINUMA (1966) ebenfalls mit Hilfe von Biotests im Embryo genügend Gibberellinaktivität zur Induktion der α-Amylase messen konnten. Es blieb strittig, ob es sich dabei um GA_3 (COHEN und PALEG, 1967) oder GA_1 (RADLEY, 1967) handelte. Weiterhin unklar ist auch, ob der Syntheseort des gefundenen Gibberellins der Embryo (McLEOD und PALMER, 1967) oder das Scutellum (RADLEY, 1967, 1969) ist. Die zuletzt zitierte Autorin fand auch, daß Zucker (z.B. Saccharose und Glucose) die Produktion gibberellinaktiven Materials im Scutellum reduziert.

Die Gibberellinbestimmungen mit den Immuntests in keimenden Gerstenkaryopsen zeigten, daß GA_1 das im Embryo der untersuchten Gersten mengenmäßig dominierende Gibberellin ist. Das trifft auch für Hordeum vulgare L.cv.Himalaya, Bochum 1978 zu, dessen hauptsächlich im Endosperm bzw. der Aleuronschicht vorkommendes Gibberellin in GA_4 ist. Bei dieser Varietät war nach 30 Stunden Keimung der Embryo nicht

mehr zur Induktion der α-Amylase im Endosperm notwendig (Abbildung 28), was mit folgendem Experiment bewiesen wurde: Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Keimung wurden die Embryonen von den Karyopsen abgetrennt, die dann noch zusätzliche 96 Stunden auf feuchtem Filterpapier inkubierten, bis die Aktivität der α-Amylase gemessen wurde.

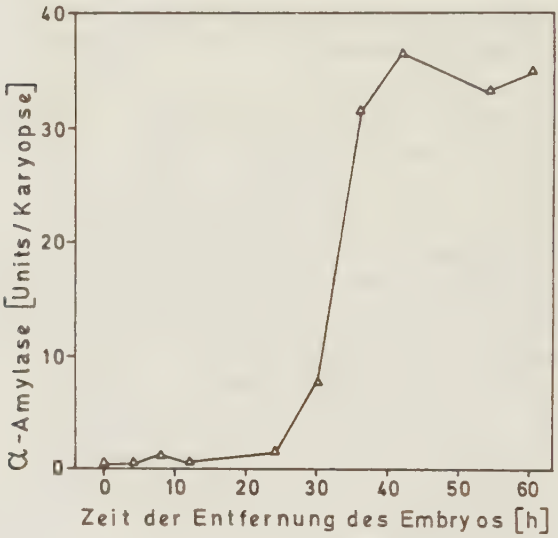


Abbildung 28: Abhängigkeit der α-Amylaseaktivität von der Präsenz des Embryos in keimenden Gerstenkaryopsen.

Falls die wirksame Substanz im Embryo für die Enzyminduktion ein Gibberellin ist, müßte es spätestens nach 30 Stunden Keimung in die Aleuronschicht diffundiert sein. In Inkubationsversuchen mit isolierten Embryonen sollte untersucht werden, ob die Präparate Gibberellin produzierten und ins Medium abgaben. Zu diesem Zweck wurden Embryonen wie beschrieben (Kapitel II.5.2.2.) in Puffer mit bzw. ohne Saccharose (2 %) bis zu 70 Stunden inkubiert und zu verschiedenen Zeiten (Abbildung 29) Gibberelline mit dem GA_1-RIA gemessen. Die Anwesenheit der Saccharose im Medium wirkte sich nicht auf die Gibberellingehalte aus, was heißen kann, daß das Scutellum kein Gibberellin abgibt, wenn die oben zitierte Hypothese stimmt. Zwei größere GA-Gipfel waren nach 4 bzw. 48 Stunden Inkubation in den Embryonen zu messen. Spezifische Gibberellinanalysen ergaben, daß GA_1 den größten Anteil am immunreaktiven Material hatte (4 Stunden: 70 % GA_1, 14 % GA_3, 16 % GA_4; 48 Stunden: 88 % GA_1, 3 % GA_3, 6 % GA_4, 3 % GA_7). Das Gibberellin war nach Berücksichtigung der erforderlichen Diffusionszeiten nicht quantitativ im Medium zu finden.

Dieses Ergebnis kann entweder bedeuten, daß GA_1 nicht ins Medium diffundiert, sondern im Embryo enzymatisch abgebaut wird, oder daß GA_1 zwar abgegeben wird, daß aber auch abbauende Enzyme ins Medium diffundieren. Experimente, in denen den Medien tritiummarkierte GA_1 (jeweils 0.1 µCi) zugegeben wurde, geben darüber einigen Aufschluß: Nach 48 Stunden wurden die Embryonen aus dem Medium entfernt, [1,2-^{3}H]-GA_1 zugegeben und in bestimmten Zeitabständen Proben entnommen, die chromatographiert wurden (Laufmittel s. Kapitel II.5.3.). 20 % der Radioaktivität cochromatographierten nach 48 Stunden mit GA_1, 80 % blieb am Start. Kontrollansätze, in denen sich [1,2-^{3}H]-GA_1 und Puffer, aber keine Embryonen befanden, zeigten nach der gleichen Zeit keinen Metabolismus des Gibberellins nach entsprechender Aufarbeitung. Wurden nach Entfernen der Embryonen die Medien 15 Minuten auf 100°C erhitzt

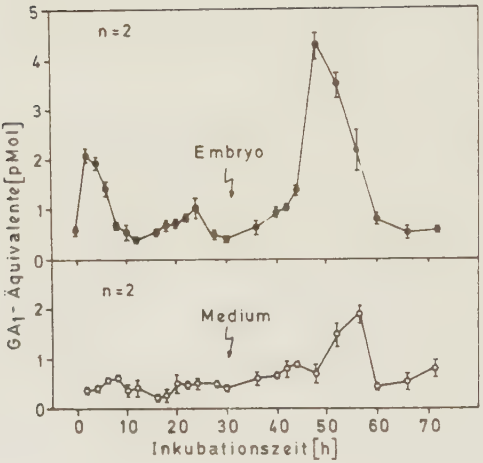


Abbildung 29: Inkubation isolierter Embryonen. Mittelwerte aus zwei durchgeführten Versuchen, einmal mit und einmal ohne Saccharose im Medium, mit Standardabweichungen.

und nach Abkühlung tritummarkierte GA_1 zugesetzt, so war nach Chromatographie ebenfalls kein Anzeichen für einen Abbau zu sehen. GA_1 kann also zwar von den Embryonen ins Medium abgegeben werden, wird aber dort teilweise von Enzymen, die gleichfalls aus dem Embryo diffundiert waren, abgebaut.

Die geschilderten Versuche geben keinen Aufschluß darüber, ob das im Embryo synthetisierte Gibberellin quantitativ ins Medium entlassen wird. Es kann auch keine klare Aussage abgeleitet werden, ob in vivo eine Diffusion von GA in die Aleuronschicht stattfindet. Daß GA_3, wie am Anfang des Kapitels erwähnt, in größeren Mengen im Embryo synthetisiert

wird, kann nach den Ergebnissen der Immuntests nicht bestätigt werden, vielmehr dominiert GA_1. Es war nach 48 Stunden mehr GA_1 in den Embryonen meßbar als bei in vivo Bedingungen, während nach 4 Stunden Inkubation eine Korrelation mit dem GA_1-Gehalt in keimenden Embryonen besteht (vgl. Abbildung 23).

5.1.4. Inkubation vom Embryo getrennter Karyopsen und isolierter Aleuronschichten

Die Induktion der α-Amylase durch exogen appliziertes Gibberellin in embryolosen Karyopsen (YOMO, 1960; PALEG, 1960) bzw. in isolierten Aleuronschichten (CHRISPEELS und VARNER, 1967a) von Gerste waren erste Indizien für eine mögliche Beteiligung von Gibberellinen an der Induktion des Enzyms in vivo. Die immunologischen Analysen des Hormonhaushaltes keimender Gerstenkaryopsen ergaben für die meisten untersuchten Varietäten, daß wenige Stunden nach einem meßbaren Gibberellinmaximum die Aktivität der α-Amylase rapide anstieg. Isolierte Embryonen von Hordeum vulgare L.cv.Himalaya (Bochum 1978) produzieren, wenn sie in wäßriger Lösung inkubiert werden, GA_1, in Aleuronschichten derselben Varietät ist dagegen in vivo vorwiegend GA_4 meßbar. In der Literatur ist zwar z.B. in Pisum sativum (YAMANE et al., 1975) und anderen höheren Pflanzen (vgl. GRAEBE und ROPERS, 1978) ein Metabolismus von GA_4 nach GA_1 beschrieben, der umgekehrte Weg ist bisher nicht bekannt (vgl. GRAEBE et al., 1980).

Um Aufschluß darüber zu erhalten, ob eine Diffusion der GA_1 in der obengenannten Varietät vom Embryo ins Endosperm bzw. die Aleuronschicht und dort eventuell ein Umbau zu GA_4 stattfinden kann, wurden Versuche gemacht, die eine Kombination der "klassischen" Induktionsexperimente mit

endogener Gibberellinanalyse darstellen.

Als Versuchsobjekt diente Hordeum vulgare L.cv.Himalaya (Bochum 1978). Zunächst wurden von Karyopsen Embryo und Endosperm getrennt und beide Präparate zusammen in Puffer inkubiert (s. Kapitel II.5.2.2.). Ein Kontrollansatz enthielt nur Endospermhälften. In einem weiteren Versuch inkubierten embryolose Karyopsen 48 Stunden in Medium, aus dem unmittelbar zuvor 48 Stunden lang gequollene isolierte Embryonen entfernt worden waren.

Nach je 48 Stunden wurden für jeden Ansatz in den Endospermhälften GA_1 und GA_4 mit dem Immuntest gemessen und die Aktivität der α-Amylase bestimmt (Tabelle 23). Wenn die präparierten Karyopsenteile einzeln inkubiert wurden, war keine Enzymaktivität meßbar. Befanden sie sich zusammen in einem Ansatz, erreichte die Aktivität der α-Amylase etwa die Hälfte des maximalen Wertes in vivo (vgl. Abbildung 21), außerdem wurden wesentlich höhere GA_4-Gehalte als bei den anderen Versuchen gefunden.

Tabelle 23: Inkubation vom Embryo befreiter Karyopsen. t = 48 Stunden. Je zwei Versuche, mit Standardabweichungen. Em = Embryonen, EK = embryolose Karyopsen, M_{Em} = Medium isolierter Embryonen. n.m. = nicht meßbar.

Ansatz	Extrahierbare GA (pMol/Em)		α-Amylase (U/EM)
	GA_1	GA_4	
EK	0.21 ± 0.1	0.15 ± 0.05	n.m.
EK + Em	0.97 ± 0.15	3.95 ± 0.18	15.4 ± 1.3
EK + M_{Em}	0.46 ± 0.13	0.20 ± 0.05	1.3 ± 0.4

Die Ergebnisse dieser Versuche und die Resultate aus den Experimenten mit isolierten Embryonen (Kapitel III.5.1.3.), wo weder größere Mengen GA_4 noch Enzymaktivität festgestellt werden konnte, deuten eine endogene GA_4-Synthese und die Aktivierung der α-Amylase im Endosperm durch Substanzen im Embryo an.

Aus Versuchen mit Gerstenendospermhälften (z.B. PALEG, 1960; YOMO, 1960) wurde zumeist der Schluß gezogen, daß die für α-Amylase induktive Substanz ein Gibberellin ist, und daß es im Embryo synthetisiert wird (vgl. BRIGGS, 1973; TOMOS und LAIDMAN, 1978). Die oben geschilderten Experimente dagegen lassen auch die Annahme zu, daß eine mögliche Wirkung aus dem Embryo stammender GA auf die Induktion des Enzyms auch indirekter Natur sein kann.

Aus Gibberellinbestimmungen der Keimungskinetiken (vgl. Abbildung 22) geht hervor, daß vorwiegend GA_1 im Embryo in frühen Keimungsstadien vorkommt. Für die untersuchte Gerstenvarietät kam also als induktives Gibberellin aus dem Embryo in erster Linie GA_1 in Betracht. Es lag daher nahe, Endospermhälften in GA_1-Lösung zu inkubieren, um einen Einfluß auf endogenen GA_4-Gehalt und αAmylaseaktivität in den Präparaten zu sehen. Ob das Vorkommen von GA_4 auf Neusynthese des Hormons zurückzuführen ist, sollte mit zusätzlicher Applikation von Hemmstoffen der GA-Biosynthese wie AMO 1618, CCC oder Phosfon D, die Zyclisierungsschritte von Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat zum Kauren inhibieren (vgl. GRAEBE und ROPERS, 1978), und Ancymidol, das die Umwandlung von Kaurenol zu Kaurenal hemmt (s. RADEMACHER und GRAEBE, 1981), untersucht werden. Verglichen werden sollten die Resultate mit den Wirkungen anderer applizierter Gibberelline wie GA_4 und GA_3 auf die Induktion der α-Amylase und den endogenen GA-Gehalt in Endospermhälften.

Diesen Versuchen voraus ging die Ermittlung der für die Applikation optimalen Gibberellinkonzentration. Dazu wurden Endospermhälften mit unterschiedlichen GA_1-Konzentrationen behandelt und nach 48 Stunden die Aktivität der α-Amylase bzw. der extrahierbare GA_4-Gehalt in den Präparaten bestimmt. Aufgrund der erhaltenen Resultate (vgl. Tabelle 24) wurde in allen weiteren Experimenten 10^{-6}M GA verwendet.

Tabelle 24: Wirkung von GA_1 unterschiedlicher Konzentration in inkubierten Endospermhälften.

Behandlung	extrahierbare GA_4 [pMol/Karyopse]	α-Amylaseaktivität [U/Karyopse]
Puffer	n.m.	n.m.
10^{-5}M GA_1	3.9	19.3
10^{-6}M GA_1	3.8	20.4
10^{-7}M GA_1	3.3	15.7
10^{-8}M GA_1	2.9	13.3
10^{-9}M GA_1	1.3	9.3
10^{-10}M GA_1	1.0	3.1
10^{-12}M GA_1	0.5	0.9
10^{-13}M GA_1	0.3	n.m

Tabelle 25 zeigt die Ergebnisse der Applikation von GA_1 und GA_4 sowie Hemmstoffen der GA-Biosynthese. Daß nach GA_1-Behandlung im Vergleich zu den Kontrollen erhöhte α-Amylaseaktivität und GA_4 meßbar waren, kann bestätigt werden. Wenn zusätzlich Hemmstoffe appliziert wurden, ist in den Endospermhälften weder GA_4 noch Enzymaktivität festzustellen. Eine unterschiedliche Wirkung der Hemmstoffe ist nicht zu ersehen. Daß die Inhibitoren der GA-Biosynthese auch toxisch auf die Produktion der α-Amylase wirken, kann ausgeschlossen werden: Wurden sie nämlich mit

GA_4 bzw. mit GA_1 und GA_4 zusammen verabreicht, besitzt die α-Amylase die gleiche Aktivität wie nach Inkubation von Endospermhälften in GA_1-Lösung. Das Enzym wird durch GA_4 nicht stärker induziert als durch GA_1; gleichfalls ist kein additiver Effekt beider Hormone zu erkennen.

Tabelle [25]: Induktion von α-Amylase durch exogen applizierte GA (10^{-6}M) und Gehalt extrahierbarer GA in embryolosen Karyopsen. Konzentrationen der Inhibitoren: 10^{-3}M
(Ancymidol: 10^{-5}M) · n = Zahl der Versuche; alle Resultate mit Standardabweichungen. n.i. = Nicht meßbar.
Versuchsobjekt: Hordeum vulgare L.cv.Himalaya, Ernte Bochum 1978.

Behandlung	n	Extrahierbare GA (pMol/Präparat)		α-Amylase (Units/Präparat)
		GA_1	GA_4	
Pufferkontrollen t=0,6,12,24,48,60 h)	4	n.i.(<0.05)	n.i.(<0.05)	n.i.(<0.1)
Gibberelline und Inhibitoren (t=48 h)				
GA_1	4	23.1±2.8	3.0±1.2	16.1±5.8
GA_1 + AMO 1618	6	23.4±1.0	n.i.	n.i.
GA_1 + CCC	2	28.7±7.1	n.i.	n.i.
GA_1 + Phosfon D	2	21.1±1.8	n.i.	n.i.
GA_1 + Ancymidol	2	20.8±0.7	0.09±0.01	0.9±0.1
GA_4	2	0.4±0.1	10.7±0.6	16.2±2.3
GA_4 + AMO 1618	4	1.5±0.2	19.0±0.4	17.3±2.3
GA_4 + CCC	2	1.4±0.2	14.0±1.0	18.5±1.8
GA_4 + Phosfon D	2	0.7±0.2	15.8±0.6	15.2±2.4
GA_1 + GA_4	2	25.2±0.3	24.1±0.9	17.9±2.4
GA_1 + GA_4 + AMO 1618	2	20.9±1.1	23.9±1.3	16.7±3.2
GA_1 + GA_4 + CCC	2	33.4±1.6	18.7±0.7	21.4±3.1
GA_1 + GA_4 + Phosfon D	2	31.1±0.9	17.6±2.1	18.6±2.6

Die erhaltenen Daten zeigen, daß der Effekt von GA_1 auf die Induktion der α-Amylase indirekt ist; Voraussetzung für die Aktivität des Enzyms scheint die Synthese von GA_4 im Endosperm zu sein. Einen Hinweis darauf geben auch kinetische Untersuchungen der α-Amylaseaktivität in inkubierten Endospermhälften (Abbildung 30): Die Aktivität des Enzyms nach Appliaktion von GA_4 mit AMO 1618 stieg etwas sechs Stunden früher an als nach Applikation mit GA_1. Da die Anwesenheit des Hemmstoffs in den GA_4-behandelten Präparaten die endogene Synthese von GA_4 ausschließt, ist die zeitlich unterschiedliche Enzymaktivierung in den beiden Ansätzen nur dadurch erklärlich, daß nach Diffusion der GA_1 in die Endospermhälften einige Stunden für die Neusynthese von GA_4 notwendig sind.

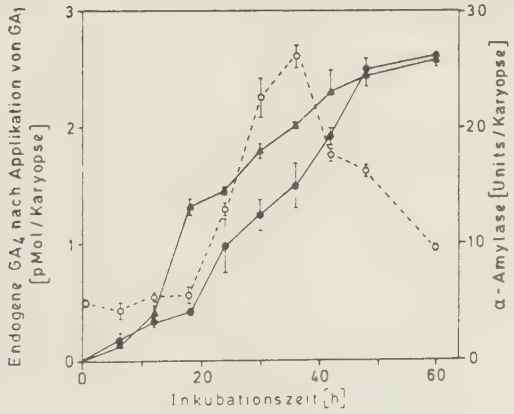


Abbildung 30: Kinetik der α-Amylaseformation in embryolosen Karyopsen nach Behandlung mit 10^{-6}M GA_1 (●—●) oder 10^{-6}M GA_4 + 10^{-3}M AMO 1618 (▲—▲). o...o = extrahierbare GA_4 nach Applikation von GA_1.
Versuchsobjekt: Hordeum vulgare L.cv.Himalaya, Ernte Bochum 1978.

Hormonanalysen in gekeimten Karyopsen von Hordeum vulgare L.cv.Himalaya (Ernte Bochum 1978) zeigten, daß der größte Teil der analysierten GA_4 in den Aleuronschichten lokalisiert ist (vgl. Tabelle 26). In vitro Versuche mit isolierten Aleuronschichten zeigten die Induzierbarkeit des Enzyms durch exogene applizierte GA (CHRISPEELS und VARNER, 1967) und seine de novo Synthese (FILNER und VARNER, 1967). Es sollte daher untersucht werden, ob die Ergebnisse der Applikationsversuche mit Endospermhälften auch qualitativ vergleichbar mit isolierten Aleuronschichten zu erhalten sind. Dazu durchgeführte Versuche zeigen, daß auch in diesem System GA_1 eine endogene GA_4-Synthese bewirkt, der dann die Induktion der α-Amylase folgt (Tabelle 19, Abbildung 31).

Tabelle 26: Effekt applizierter GA und GA-Biosyntheseinhibitoren auf endogene GA_4 und α-Amylaseaktivität in isolierten Aleuronschichten. Konzentrationen: GA 10^{-6}M, Inhibitor 10^{-3}M. Inkubation 24 Stunden bei 25°C in je 5 ml gepufferter Lösung. n.m. = nicht meßbar.

Behandlung	Pro Aleuronschicht extrahierbare GA (pMol)		Ins Medium abgegebene α-Amylase (U/Aleuronschicht)
	GA_1	GA_4	
Pufferkontrolle	n.i.	n.i.	n.i.
GA_1	3.4	0.6	2.1
GA_1 + AMO 1618	2.7	n.i.	n.i.
GA_1 + CCC	3.2	n.i.	n.i.
GA_1 + GA_4	2.5	2.4	3.3
GA_1 + GA_4 + AMO 1618	3.4	3.3	3.2
GA_1 + GA_4 + CCC	3.2	3.3	3.0

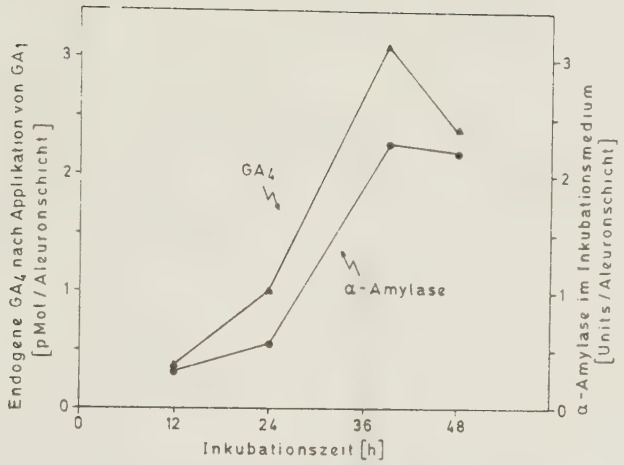


Abbildung 31: Zeitlicher Verlauf der Akkumulation endogener GA_4 und der Sekretion von α-Amylase ins Medium bei Inkubation isolierter Aleuronschichten in 10^{-6}M GA_1. T = 14.4°C

GA_4 in Endospermhälften unter 0.3 pMol ist nicht zur Induktion der α-Amylase in der Lage (vgl. Tabelle 24). Nach Fütterung radioaktiver GA_4 in nichtinduktiven Konzentrationen (0.24 pMol [1,2-^{3}H]-GA_4, ≙ 0.005 µCi) an inkubierte embryolose Karyopsen erwies sich, daß sie nicht metabolisiert wird (Abbildung 32). Man kann daraus ableiten, daß bei den in vitro Experimenten GA_4 direkt die α-Amylase induziert und nicht Vorstufe einer induktiven Substanz ist. Ein Metabolismus von GA_1 zu GA_4 konnte ebenfalls nicht gesehen werden: Bei Applikation von 0.1 µCi[1,2-^{3}H]-GA_1 zusätzlich zu 10^{-6}M GA_1 war nach Extraktion und Chromatographie der Präparate (wie beschrieben) nur eine Bande zu identifizieren, die mit GA_1 cochromatographierte. Eine Kontamination der für alle Induktionsversuche eingesetzten GA_1 mit GA_4 konnte nach Chromatographie und Analyse der eluierten Ban-

den mit dem Immuntest ausgeschlossen werden.

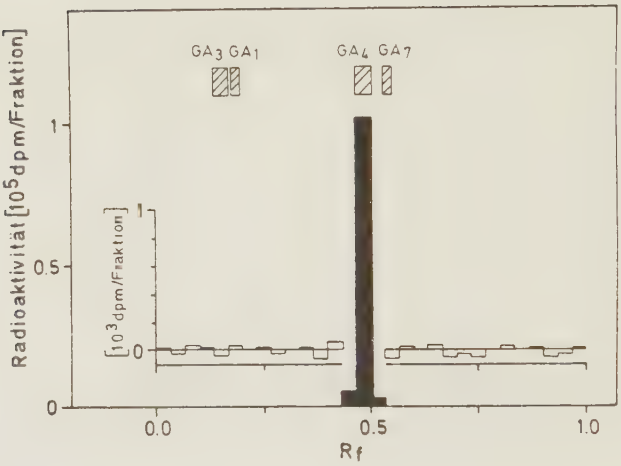


Abbildung 32: Fütterung von [1,2-^{3}H]-GA_4 an embryolose Karyopsen (0.005 µCi = 0.24 pMol pro Karyopse; Konzentration 0.6 x 10^{-9}M). Extraktion gewaschener Karyopsen und Chromatographie der methanolischen Extrakte wie beschrieben (Kapitel II.5.2.2.). Radioaktivitätsmessung der eluierten Fraktionen im Szintillationszähler.

Zu überprüfen war, ob die Synthese von GA_4 in vitro im Endosperm bzw. der Aleuronschicht ein spezifischer GA_1-Effekt ist: Dazu wurde Endospermhälften GA_3 appliziert. Verwendet wurde dazu eine HPLC-gereinigte GA_3, die von Prof. MacMillan, Bristol, zur Verfügung gestellt worden war. Eine immunologische Analyse wie für GA_1 beschrieben ergab weder eine Kontamination durch GA_1 noch durch GA_4.

Die kommerziell erhältliche GA_3 war, dies ergab sich gleichfalls nach immunologischer Analyse, zu ca. 5 % mit GA_4 verunreinigt. Die induktive Wirkung beider Chargen zeigt Tabelle 27. Die kontaminierte GA_3 bewirkt eine applizierter GA_1 vergleichbare Aktivität der α-Amylase. Zusammen mit GA-Biosyntheseinhibitoren verabreicht ist eine Hemmung der Enzymaktivität um ca. 35 % zu sehen. Die HPLC-gereinigte GA_3 bewirkte mit Hemmstoff 60 % weniger α-Amylaseaktivität. Zu messen war in allen Versuchsansätzen auch endogene GA_4, die nach Applikation der gereinigten GA_3 zusammen mit Ancymidol 22 % des Wertes bei Behandlung der Präparate mit derselben GA ohne Inhibitor erreichte. GA_3 kann also wie GA_1 eine GA_4-Synthese und die Induktion der α-Amylase in vitro bewirken. Die Biosynthese kann dabei nicht völlig mit Inhibitoren unterdrückt werden.

Tabelle 27: Induktion der α-Amylase in embryolosen Karyopsen durch GA_3. Konzentrationen: GA_3 10^{-6}M, AMO 1618 10^{-3}M, Ancymidol 10^{-5}M. a = kommerzielle GA_3 (mit 5 % GA_4), b = HPLC - gereinigte GA_3 (ca. 98 % rein). n = Zahl der Versuche, mit Standardabweichungen.

Behandlung	Extrahierbare GA [pMol/Karyopse]		n = 2	α-Amylase [U/Karyopse]
	GA_1	GA_4		
Pufferkontrolle	n.m.	n.m.		n.m.
GA_3 a	0.7±0.2	2.4±0.4		19.5±6.4
GA_3 a + AMO 1618	0.9±0.1	1.1±0.1		12.4±1.5
GA_3 a + Ancymidol	0.7±0.1	1.0±0.2		13.5±0.9
GA_3 b	0.9±0.2	2.7±0.2		21.9±1.8
GA_3 b + Ancymidol	1.1±0.2	0.6±0.1		8.7±0.3

Zwischen der gemessenen Aktivität der α-Amylase und dem Gehalt extrahierbarer GA_4 in embryolosen Karyopsen nach Applikation von GA mit und ohne GA-Biosyntheseinhibitor bzw. nach gemeinsamer Inkubation von Embryonen und Endospermhälften besteht eine positive und lineare Korrelation (Abbildung 33).

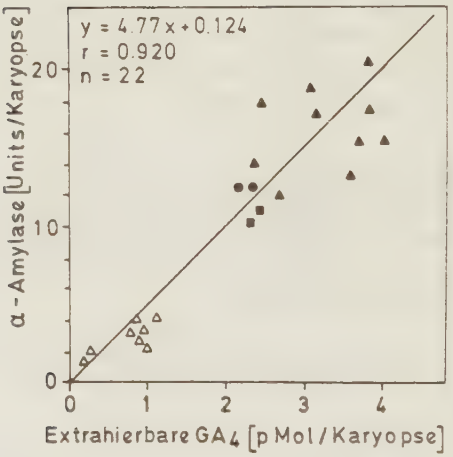


Abbildung 33: Korrelation zwischen extrahierbarer GA_4 und α-Amylaseaktivität in inkubierten Endospermhälften. Bestimmungen: 48 h nach Applikation. von: ▲ = 10^{-6}M GA_1; △ = 10^{-6}M GA_1 + 10^{-3}M Inhibitor; ■ = 10^{-6}M kommerzielle GA_3; ● = isolierte Embryonen.

5.1.5.Gibberellinkonjugate in Gerstenkaryopsen

Die in Kapitel 5.1.4. gezeigten Daten können nicht ausschließen,daß ein Anstieg des Gibberellingehaltes in Aleuronschichten keimender Gerstenkaryopsen durch Freisetzung der Hormone aus Konjugaten bedingt ist.Diese Auffassung wird auch in der Literatur z.T. vertreten (TREWAVAS,1982),aber bisher ist es trotz intensiver Untersuchungen (YOMO und IIMUMA,1966;DATHE und SEMBDNER 1978) nicht gelungen,signifikante Mengen von Gibberellinkonjugaten einwandfrei zu identifizieren.Es gibt verschiedene Methoden zur Spaltung von Gibberellinglucosiden, (MÜLLER et al.,1978).Durchgeführt wurden die Spaltungen von potentiellen Gibberellinkonjugaten in Gerstenkaryopsen mit ß-Glucosidase,einer unspezifischen Helianthus-Esterase und Enzymgemischen wie Macerase und Cellulysin die vorwiegend Zellwandkohlenhydrate abbauen.Ebenfalls eingesetzt wurde mit Pronase E ein proteolytisches Enzym,um eventuell von Proteinmatrix umgebene Gibberelline freizusetzen.

Die Effizienz aller Enzymreaktionen wurde mit entsprechenden Kontrollversuchen überprüft,alle Reaktionsansätze enthielten tritiummarkierte GA_1 zur Berechnung der Wiederfinderaten (70 -80%).Die Konjugatspaltungen wurden mit extrahiertem Material von Hordeum vulgare L.cv.Himalaya (Ernten Bochum 1978 und 1982) durchgeführt.Vor Beginn jeder Enzymreaktion wurden die feien Gibberelline aus den Ansätzen extrahiert. Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der enzymatischen Hydrolysen.In allen Versuchen war der Anteil nach Spaltung immunologisch bestimmbarer GA_1 bzw. GA_4 verglichen mit den gemessenen freien Gibberellinen gering.Es ist daher unwahrscheinlich,daß die in den untersuchten Objekten gefundenen hohen GA-Gehalte aus Konjugaten zustandekommen.

Tabelle 28: Vorkommen von Gibberellinkonjugaten im ruhenden Korn und gekeimten Karyopsen. Gibberellinäquivalente in pmol pro Karyopse. n.m. = nicht meßbar.

Gerste	Enzym		Extrahierbare GA_1 GA_4 vor Enzymbehandlung		GA GA_1 GA_4 (pMol/Korn) nach Hydrolyse freigesetzt	
Himalaya 1982	t_o h	Pronase E	0.26	n.m.	0.03	n.m.
	Methanol. Extrakte	Glucosidase + Esterase	0.26	n.m.	0.03	n.m.
	Zentrifugate	Pronase E	0.02	n.m.	0.08	n.m.
		Glucosidase +Esterase	0.02	n.m.	0.08	n.m.
		Macerase + Cellulysin	0.02	n.m.	0.08	n.m.
Himalaya 1978	t_o h	Glucosidase	1.3	1.1	0.2	0.1
	Methanol. Extrakte	Esterase	1.1	0.8	0.5	0.1
	Zentrifugate	Macerase +Cellulysin	1.3	0.8	0.1	0.1
	t_{48} h					
	Methanol. Extrakte	Glucosidase	1.2	6.6	0.2	0.45
		Esterase	1.3	7.8	0.4	0.2
	Zentrifugate	Macerase +Cellulysin	1.4	8.0	0.35	0.35

5.2. Untersuchungen zum Metabolismus der Abscisinsäure in keimenden Gerstenkaryopsen

Von vielen Autoren (z.B. KHAN und DOWNING, 1968; KHAN und TAO, 1978) wird eine Hemmung der Keimung durch ABA in Gerstenkaryopsen beschrieben. In Versuchen mit isolierten Aleuronschichten fanden verschiedene Autoren (CHRISPEELS und VARNER, 1967 b; HO und VARNER, 1976) einen hemmenden Einfluß applizierter Abscisinsäure (ABA) auf die Induktion der α-Amylase durch Gibberellin. Der Hemmeffekt ließ sich auch durch erhöhte GA-Zugabe nicht vollständig aufheben. Dies waren erste Anzeichen dafür, daß die Kontrolle der Synthese des Enzyms durch mindestens zwei verschiedene Hormone erfolgt. Endogene Messungen von ABA in Gerstenkaryopsen sind aus der Literatur nicht bekannt. Da der Radioimmuntest für ABA (WEILER, 1979) die selektive Bestimmung sowohl freier ABA als auch ihrer C_1-gebundenen Konjugate erlaubt, sollen beide genannten Effekte durch endogene ABA-Analysen näher untersucht werden.

Mit dem Immuntest durchgeführte Messungen von ABA in keimenden Karyopsen von Hordeum vulgare L.cv.Himalaya (Bochum 1978) ergaben erstmalig (vgl. Abbildung 21), daß der im ruhenden Korn gefundene vergleichsweise hohe ABA-Spiegel schon nach wenigen Stunden Keimung stark abnimmt; insbesondere zur Zeit des hohen endogenen Gibberellingehaltes und des Beginns steigender α-Amylaseaktivität erreichten die ABA-Gehalte ein Minimum.

Fütterungen mit ^{14}C-markierter ABA (DASHEK et al., 1979) und ^{3}H-ABA (HO und UKNES, 1982) in isolierten Aleuronschichten von Gerste ergaben eine Umwandlung des Hormons größtenteils zu Konjugaten bzw. Phaseinsäure. Letztere ist mit dem Immuntest für ABA nicht meßbar; um aber aus einer Umwandlung

der ABA zu diesem Metaboliten sehen zu können, wurden Fütterungsversuche mit [^{3}H](±)-ABA (spezifische Aktivität: 33 Ci/mMol) durchgeführt. Die tritiummarkierte ABA wurde wegen ihrer hohen spezifischen Aktivität, die eine hohe Nachweisempfindlichkeit gestattet, verwendet; neben dem Racemat standen auch tritiummarkierte [+]-ABA und [-]-ABA gleicher spezifischer Aktivität (durch Trennung von [^{3}H](±)-ABA nach WEILER et al., 1982) zur Verfügung. Aus Untersuchungen des ABA-Metabolismus in höheren Pflanzen (vgl. MILBORROW, 1978) ist bekannt, daß [+]-ABA die physiologisch aktive Form darstellt.

5.2.1. Hemmung der Keimung von Gerstenkaryopsen durch Abscisinsäure

Es konnte gezeigt werden, daß ABA in frühen Stadien der Keimung aus dem Embryo ins Endosperm transportiert wird und dort in physiologisch inaktive Formen umgewandelt wird. Ein Teil der ABA wird auch im Embryo metabolisiert. Es ist anzunehmen, daß die Abnahme freier ABA im Embryo die Voraussetzung für den Beginn der Keimungsprozesse ist. Bekannt ist z.B. für Gerste, daß ABA die Entwicklung des Embryos hemmt (KHAN und DOWNING; 1968; NORSTOG, 1972), im Weizen wurde ebenfalls eine Hemmung der Keimung durch ABA festgestellt (KING und PATRICK, 1982).

Mit 10^{-4}M ABA konnte bei Karyopsen von Hordeum vulgare L.cv.Himalaya (Pullman 1980) eine Unterdrückung der Keimung zu 97 % erreicht werden. Dazu wurden Karyopsen in Puffer mit ABA verschiedener Konzentrationen bzw. 10^{-6}M GA_1 inkubiert (Tabelle 29, Abbildung 34; vgl. Kapitel II.6.). Mit isolierten Embryonen konnte dieser Hemmeffekt ebenfalls bei Inkubation in 10^{-4}M ABA erzielt werden.

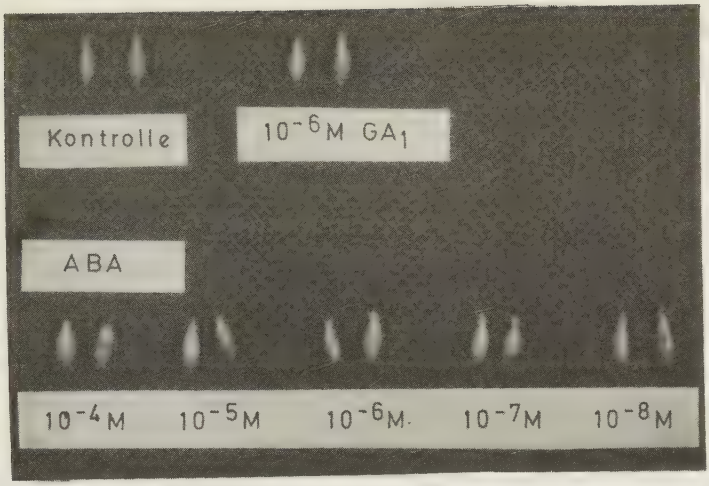


Abbildung 34: Inkubation von Gerstenkaryopsen in ABA bzw. GA_1 . Kontrolle = 0.1M Phosphatpuffer pH 5.5

Tabelle 29 : Keimungsinhibierung (%) durch Abscisinsäure. Pro Versuch 100 Karyopsen; 96 h Inkubation im Dunkeln bei 25°C unter Schütteln.

Behandlung	Zahl der gekeimten Karyopsen	% Hemmung
Pufferkontrolle	98	0
10^{-8}M ABA	85	15
10^{-7}M ABA	64	36
10^{-6}M ABA	44	56
10^{-5}M ABA	23	77
10^{-4}M ABA	3	97
10^{-6}M GA_1	99	0
10^{-4}M ABA + 10^{-6}M GA_1	2	98

5.2.2. Radioimmunologische Messungen von ABA und Konjugaten

5.2.2.1. Keimende Karyopsen

Es wurden nach Keimung radioimmunologische Messungen in Karyopsen aller aufgeführten Gerstenvarietäten (vgl. Kapitel II.5.1.) durchgeführt. Die Ergebnisse bei den im folgenden vorgestellten zwei Sorten sind repräsentativ für alle untersuchten Objekte.

Bei Hordeum vulgare L.cv.Himalaya (Pullman 1980) hat die ABA im intakten Korn nach 30 Stunden ein Minimum erreicht (Abbildung 35 a). Es ist Abbildung 35 weiterhin zu entnehmen, daß die Abnahme des ABA-Siegels zuerst im Embryo, der in ungekeimten Zustand mehr als 60 % der ABA der Karoypse enthält, geschieht. Dabei könnte sowohl eine Umwandlung in Konjugate als auch eine Diffusion ins Endosperm eine Rolle spielen; die Meßwerte lassen eine Beteiligung beider Mechanismen wahrscheinlich erscheinen. Der Gehalt an ABA im Endosperm erhöht sich nämlich unmittelbar nach der Abnahme des Hormons im Embryo; dem Erreichen des Minimums nach 30 Stunden geht ein starker Anstieg des Gehalts von ABA-Konjugaten im Endosperm voraus. Andererseits ist auch im Embryo ein Anstieg der Konjugate zu sehen. Es ist also zu vermuten, daß während der Keimung ein Teil der ABA direkt im Embryo metabolisiert wird, während der Rest ins Endosperm diffundiert und zusammen mit der dort bereits vorliegenden ABA fast quantitativ umgesetzt wird.

Bei Hordeum vulgare L.cv.Himalaya (Bochum 1982) ergaben die radioimmunologischen Messungen qualitativ gleiche Ergebnisse (Abbildung 35 b), allerdings sind die endogenen ABA-Gehalte hier wesentlich geringer. Die Ergebnisse der endogenen Messungen der Absisinsäure in den untersuchten Gerstensor-

ten zeigen ein weitaus einheitlicheres Bild als die Resultate der Gibberellinbestimmungen (Kapitel III.5.1.).

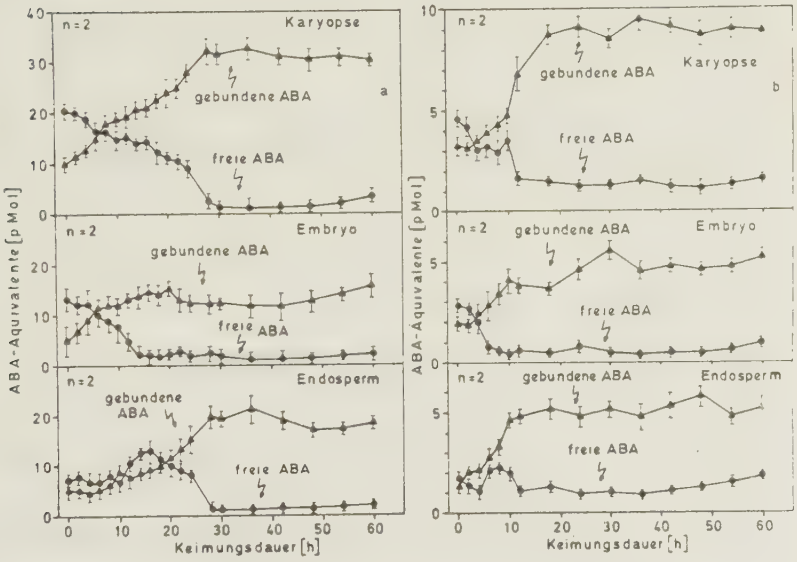


Abbildung 35: Veränderung des Gehalts von ABA und ihrer C_1-gebundenen Konjugate in keimenden Gerstenkaryopsen.
a Hordeum vulgare L.cv.Himalayå, Pullman 1980
b Hordeum vulgare L.cv.Himalaya, Bochum 1982
n = Anzahl der Versuche, mit Standardabweichungen.

5.2.2.2. Isolierte Embryonen

Die im vorhergehenden beschriebenen immunologischen ABA-Analysen zeigten, daß ABA bei der Keimung der Gerste eine wichtige physiologische Rolle zu spielen scheint; es konnte aber nicht einwandfrei geklärt werden, ob die Abnahme freier ABA im Embryo primär eine Folge der Diffusion ins Endosperm oder der Umsetzung zu konjugaten, die man in höheren Pflanzen als inaktive Form des Hormons zu sehen hat (vgl. MILBORROW, 1978). Um dies näher zu untersuchen wurden isolierte Embryonen wie beschrieben in Puffer inkubiert (Kapitel II.5.2.2.). Es wurden mehrere Gerstensorten untersucht, die Ergebnisse sollen anhand von Hordeum vulgare L.cv. Himalaya (Pullman 1980) gezeigt werden.

Wie in Abbildung 36 zu erkennen ist, beginnt unmittelbar nach Abnahme der ABA im Embryo ein Transport des Hormons ins Medium. Gleichzeitig ist im Embryo ein Anstieg des Gehalts an Konjugaten feststellbar. Die Menge der ins Medium abgegebenen ABA-Menge beträgt ca. 9 pMol/Embryo. In der frühen Phase der Keimung (vgl. Abbildung 33) sinkt der ABA-Gehalt im Embryo um etwa 10 pMol/Karyopse ab.

5.2.3. Metabolismus radioaktiver ABA in Hordeum vulgare L.cv.Himalaya

Bei Beginn der Keimung von Gerstenkaryopsen konnte bereits mit Hilfe des Immuntests gezeigt werden, daß ABA in Konjugate überführt wird. Eine Umwandlung der ABA bei der Keimung in andere Metaboliten erscheint ebenfalls denkbar. Bei Fütterung radioaktiv markierter ABA an isolierte Aleuronschichten konnte eine Umwandlung des Hormons zu Konjugaten,

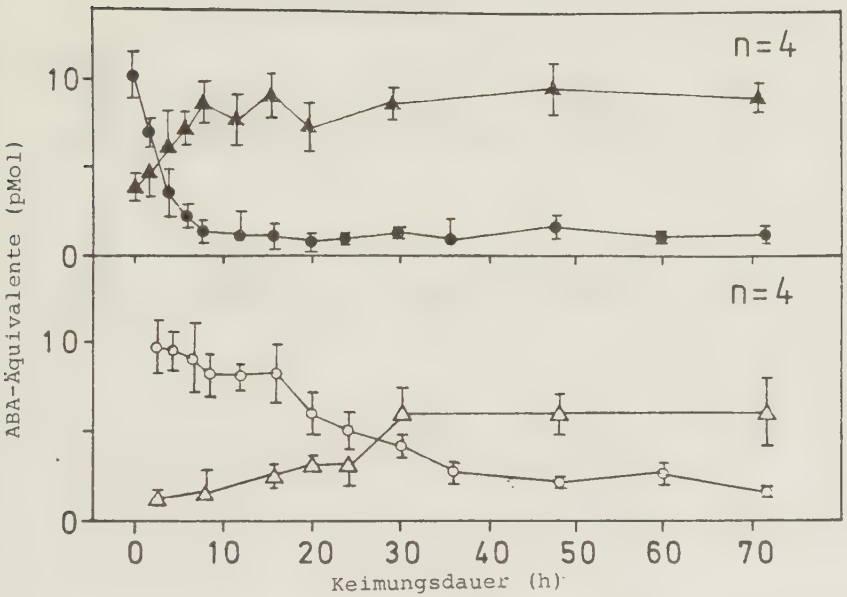


Abbildung 36: Hordeum vulgare L.cv.Himalaya (Pullman 1980). Inkubation isolierter Embryonen
a) ABA (●) und Konjugate (▲) im Embryo.
b) ABA (o) und Konjugate (△) im Medium.
n = Anzahl der Versuche, mit Standardabweichungen

Phaseinsäure und Dihydrophaseinsäure gezeigt werden (DASHEK et al., 1979; HO und UKNES, 1982). Die Möglichkeit der Überführung von ABA zu den beiden letztgenannten Metaboliten ist auch in den frühen Phasen der Keimung von Gerstenkaryopsen denkbar. Dies festzustellen, ist mit Hilfe des Immuntests nicht möglich; daher sollte die Fütterung von tritiummarkierter ABA darüber näheren Aufschluß geben.

Da der bisher festgestellte Metabolismus der ABA bei der Keimung vorwiegend im Embryo ablief, wurden [^{3}H±]ABA sowie ihre tritiummarkierten Isomeren (vgl. Kapitel II.6.2.) zu wäßrigen Lösungen mit isolierten Embryonen gegeben. Die Ansätze wurden jeweils 24 Stunden bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Zur Kontrolle dienten Ansätze mit den radioaktiven Derivaten, aber ohne Embryonen. Alle Ansätze wurden wie beschrieben (Kapitel II.6.3.) aufgearbeitet, chromatographiert und die eluierten Fraktionen im Szintillationszähler gemessen.

Bei den Kontrollen war kein Metabolismus radioaktiver ABA festzustellen. Die Ergebnisse der Fütterungen zeigt Abbildung 37. Bei Applikation racemischer ABA wird mehr als 55 % der Radioaktivität zu Substanzen umgewandelt, die nach Chromatographie am Start zu finden sind bzw. mit dem ABA-ß-D-glucopyranosylester cochromatographieren. Etwa 30 % zeigen Cochromatographie mit Phaseinsäure, während der Rest anscheinend nicht metabolisiert wird. Fütterungen mit [+]ABA zeigten ein ähnliches Ergebnis, während die physiologisch inaktive [-]ABA vorwiegend zu polaren Metaboliten umgebaut wird (R_f = 0.05). Beide verwendete Gerstenvarietäten zeigten den beschriebenen Metabolismus.

Qualitativ gleiche Ergebnisse erbrachten Fütterungen radioaktiver ABA in Inkubationsansätzen mit intakt belassenen Karyopsen. Ebenfalls kein Unterschied im metabolischen Verhalten der gefütterten ABA war festzustellen, wenn ^{3}H[±]ABA und 10^{-4}M nichtradioaktive [+]ABA gefüttert wurden. Die Ergebnisse zeigen, daß ähnliche Produkte bei Fütterungen an Embryonen oder Karyopsen gebildet werden wie in gleichartigen Versuchen mit isolierten Aleuronschichten (HO und UKNES; 1982).

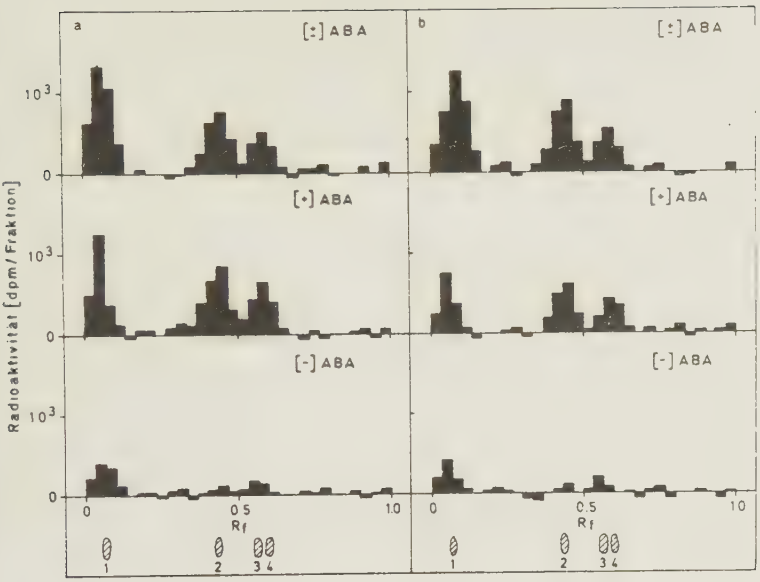


Abbildung 37: Fütterung tritiummarkierter [+]ABA und ihrer Isomeren. Eingesetzte Radioaktivitäten: 0.025 µCi ([±]ABA, [+]ABA = 0.6 pMol), 0.01 µCi ([-]ABA = 0.24 pMol). Versuchsobjekte: Hordeum vulgare L.cv.Himalaya (a) Pullmann 1980, b) Bochum 1982). Referenzen: 1 = ABA-ß-D-glucopyranosylester, 2 = Phaseinsäure, 3 = cis-trans-[±]-ABA, 4 = Trans-trans-[±]-ABA.

Vergleicht man die Daten der Fütterungen mit denen der immunologischen endogenen Messungen (Abbildung 35), so ergeben sich einige leichte Diskrepanzen: In keimenden Karyopsen war der Grad der Abnahme von ABA in etwa identisch mit dem zusätzlich meßbaren Gehalt an Konjugaten, gemessen mit dem Immuntest. Dies deutet auf einen vollständigen Umbau der ABA zu

Konjugaten hin. Bei den Fütterungen radioaktiv markierter ABA setzt sich etwa 38 % der zugegebenen Radioaktivität wahrscheinlich zu Konjugaten und Phaseinsäure um, wobei das Verhältnis der beiden neuen Metaboliten etwa 2 : 1 ist.

5.2.4. Hemmung der Aktivität der α-Amylase in embryolosen Karyopsen durch Abscisinsäure

Neben den in Kapitel III.5.1.4. beschriebenen Induktionsversuchen in embryolosen Karyopsen wurde auch der Einfluß exogener ABA auf die Synthese der α-Amylase untersucht (Tabelle 21).Bei allen Versuchsobjekten wurde gefunden,daß wie auch schon von CHRISPEELS und VARNER (1967 b) beschrieben, ABA die durch Gibberellinzugabe bewirkte Synthese des Enzyms vermindert.

Bei Hordeum vulgare L.cv.Himalaya (Bochum 1978) zeigten die Ergebnisse der Applikationen von GA und Hemmstoffen,daß in embryolosen Karyopsen GA_4 neu synthetisiert und als Induktor der α-Amylase anzusehen ist.Es war das bisher einzige Indiz für eine Synthese von GA_4 in Aleuronschichten bzw. für einen direkten Einfluß eines Gibberellins auf die Aktivität der α-Amylase.In diesem untersuchten Objekt (Tabelle30) ist auch eine Unterdrückung endogener GA_4-Synthese nach Applikation von von ABA und GA_1 in Endospermhälften zu beobachten. Dabei fällt auf,daß die Hemmung der α-Amylaseaktivität nahezu vollständig ist,während die Hemmung der GA_4-Synthese ca. 60% beträgt.Es deutet daruf hin,daß die Hemmung der α-Amylase durch ABA in vitro auf zwei Arten erfolgt:einmal indirekt durch Unterdrückung der GA_4-Synthese,aber auch durch direkte Inhibition der α-Amylase.

Tabelle 30: Hemmung der Aktivität der α-Amylase und endogener GA_4-Synthese durch Applikation von ABA zu embryolosen Karyopsen.
2 Versuche,mit Standardabweichungen

Behandlung	extrahierbare GA_4 (pMol)	α-Amylase (U/Karyopse)
Pufferkontrolle	n.m.	n.m.
GA_1 (10^{-6}M)	3.0±1.2	23.1±2.8
GA_1 + ABA (je 10^{-6}M)	1.04±0.3	1.0 ±0.1

n.m. = nicht meßbar

IV. Diskussion

Das Thema der vorliegenden Arbeit,die immunologische Analyse des Hormonhaushaltes keimender Gerstenkaryopsen , impliziert die Anwendung eines im Bereich der Pflanzenphysiologie relativ neuen Analyseverfahrens an einem klassischen Objekt der Physiologie pflanzlicher Wuchsstoffe. Mit der Entwicklung von Radio- und Enzymimmuntests für physiologisch aktive Gibberel ine sollte erstmals die Möglichkeit geschaffen werden,im Verein mit bereits vorhandenen immunologischen Bestimmungsverfahren für andere Phytohormone (vgl.WEILER,1982) einen Einblick in die komplexe hormonelle Regulation der Keimung und der Mobilisierung hydrolytischer Enzyme in Gerstenkaryopsen zu gewinnen.

Es mußten daher zunächst Gibberellin-Protein-Konjugate (Immunogene) zur Induktion spezifischer Antikörper synthetisiert werden.Nach Markierung von Gibberellin-Antigenen mit Hilfe von radioaktiven Isotopen und mit Enzymen hoher spezifischer Aktivität wurden die erzeugten Antisera auf das Vorhandensein der erwünschten Antikörper geprüft.Daran anschließend wurde die Spezifität der Sera ermittelt,die Immuntests optimiert und sodann auf Genauigkeit und Reproduzierbarkeit überprüft.

Bei den Immunogensynthesen wurde eine neue Kopplungsmethode angewendet:Gibberelline wurden über ihre Anhydride an Rinderserumalbumin gekoppelt.Die Immunogene wiesen höhere Kopplungsraten auf als die von WEILER und WIECZOREK (1981) synthetisierten Gibberellinkonjugate (vgl. Tabelle 3), allerdings hatte dies keinen erkennbaren Einfluß auf Spezifität und Empfindlichkeit der Immuntests (vgl.Kapitel III.4.).

Funktionelle Gruppen eines Haptens werden am besten von den Antikörpern erkannt,wenn sie möglichst weit von der Kopp-

lungsstelle entfernt sind (LANDSTEINER,1945).Die Carboxylgruppe in C_7-Stellung ist allen Gibberellinen gemeinsam; eine Kopplung über diese funktionelle Gruppe läßt diejenigen Strukturen des Moleküls unverändert,in denen sich die einzelnen Gibberelline chemisch unterscheiden,z.B. durch den Lactonring zwischen den Kohlenstoffatomen C_4 und C_{10} oder das Hydroxylierungsmuster an Ring A und an Ring D (vgl. Abbildung 1 und 4).Diese Substituenten können somit im Tier als antigene Determinanten dienen, was eine Voraussetzung für die Produktion spezifischer Antikörper ist.

Dieser Gesichtspunkt sollte auch bei der Synthese der markierten Gibberellinantigene berücksichtigt werden. Die Herstellung radioaktiv markierter Derivate von GA_3 und GA_9 erfolgte über bereits beschriebene Intermediate (CROSS et al., 1964) durch Ersetzen der exozyklischen Doppelbindung zwischen C_{16} und C_{17} durch eine Ketogruppe (Abbildung 6) und deren Reduktion mit NaB^3H_4, wodurch Tritium in die Moleküle eingeführt wurde.

Von GA_3-17-Norketon und GA_9-17-Norketon wurden nach Synthese und dünnschichtchromatographischer Reinigung Massenspektren aufgenommen (M^+ 348 bzw. 318).Die Fragmentierungsmuster zeigen Gemeinsamkeiten (Abbildung 7), das des GA_9-17-Norketons ist mit dem in der Literatur beschriebenen (LIN und HEFTMAN,1979) identisch.Die Ausbeuten dieser Teilreaktionen betrugen 10% (GA_3) und 90% (GA_9).Die Diskrepanz läßt sich dadurch erklären,daß GA_3 in Ring A noch eine Doppelbindung mit benachbarter OH-Gruppe aufweist.Nach Addition von Osmiumtetroxid an beiden Doppelbindungen und nachfolgender Reaktion von Natriumperjodat mit allen Hydroxylgruppen wird der Ring vermutlich gespalten,so daß neben dem erwünschten Produkt noch andere Derivate entstehen könnten.

Die Ausbeuten bei den Radiosynthesen (jeweils weniger als 5% der eingesetzten Radioaktivitäten) sind sehr gering im Vergleich zu den Vorversuchen mit nicht markiertem Borhydrid. (ca.40%).Es ist zu vermuten,daß unter den gewählten Bedingungen (GA im Überschuß) die Carboxylgruppe der Gibberellinderivate bei der Reaktion das säurelabile NaB^3H_4 zersetzt,bevor es reduktiv auf die Ketogruppe wirken kann. Eine Reduktion in gepufferter Lösung bzw. eine Reduktion der Methylester sollte hier bessere Ausbeuten bringen.Beide radioaktiv markierte Derivate besaßen eine radiochemische Reinheit von über 95% und zeigten auch nach drei Jahren keinen Aktivitätsverlust.Die spezifische Aktivität betrug für das reduzierte [^{3}H]-GA_3-17-Norketon 5.9 Ci/mMol,für das reduzierte [^{3}H]-GA_9-17-Norketon 4.9 Ci/mMol.

Unter Benutzung dieser radioaktiv markierten Derivate und von [1,2-^{3}H]-GA_1 (spezifische Aktivität: 38 Ci/mMol) wurden Radioimmuntests für GA_3,GA_9 und GA_1 aufgestellt. Bei ihrer Optimierung erwiesen sich die von WEILER und WIECZOREK (1981) für den ^{125}J-GA_3-RIA gefundenen Reaktionsbedingungen als die geeignetsten.Die Meßbereiche der Gibberellin-Radioimmuntests lagen zwischen 0.05 und 5 pMol,die Werte für B/B_0 = 50% betrugen 0.7 pMol (GA_1-RIA), 1.3 pMol (GA_3-RIA) und 1.1 pMol (GA_9-RIA).Sie erreichten damit nicht die Empfindlichkeit des ^{125}J-GA_3-RIA,was aber aufgrund der größeren spezifischen Aktivität dieses Nuklids abzusehen war.Der Vorteil der entwickelten Radioimmuntests liegt in der größeren Stabilität der tritiummarkierten Antigene.Diese wurden in den Tests als Methylester eingesetzt,was eine etwa zehnfach höhere Bindung zur Folge hatte als bei Einsatz der freien Säure.Der Grund ist in der Tatsache zu suchen,daß die Antikörper von Konjugaten induziert wurden,in denen die Carboxylgruppe des Gibberellins über eine Amidbindung ans Protein gekoppelt war.Aus diesem Grunde erkennt der Antikörper die freie Säuregruppe nur schlecht.Die Überführung der

Gibberellinderivate in ihre Methylester war eine Möglichkeit,die Carboxylgruppe dem Zustand anzugleichen, den sie im Immunogen aufwies.Aus dem gleichen Grunde wurden auch die unmarkierten Antigene in Form ihrer Methylester als Standards eingesetzt.Die Alternative zur Methylierung wäre z.B. die Induktion spezifischer Antikörper durch Gibberellin-Protein-Konjugate,bei denen die Kopplung über die exozyklische Doppelbindung der Gibberelline erfolgte.

Die Kopplung von GA_3 und GA_4 an alkalische Phosphatase zur Synthese enzymmarkierter Antigene erfolgte nach der gleichen Methode wie die Synthese der Immunogene (vgl. Abbildungen 5 und 9).Die Ausbeuten bei den Reaktionen betrugen nur etwa 20% der eingesetzten Enzymaktivitäten. Möglicherweise wird wegen des relativ hohen Anteils organischer Lösungsmittel in den Reaktionsansätzen ein Teil der alkalischen Phosphatase denaturiert.Die Stabilität der GA-AP-Derivate ist zufriedenstellend (ca.30% Aktivitätsverlust nach 2 Jahren).Die spezifischen Aktivitäten betrugen für das markierte Antigen der GA_3 15 U/nMol und für das der GA_4 12 U/nMol.

Die zur Markierung von GA_3 und GA_4 verwendete alkalische Phosphatase ermöglichte mit ihrer hohen spezifischen Aktivität (>2500 U/mg Protein) die Entwicklung äußerst sensitiver Enzymimmuntests.Die Enzymkonjugate von GA_3 und GA_4 zeigten mit den Immunglobulinfraktionen der entsprechenden Antisera im Festphasen-Enzymimmuntest maximale Bindungen von 9% (GA_3-AP) bzw. 6% (GA_4-AP).Wie bei den Radioimmuntests war auch in den Enzymimmuntests bei Verwendung der GA-Methylester als Standards die Sensitivität wesentlich größer (ca. 100fach)als bei Einsatz der freien Säuren;dies ist ähnlich wie schon für die Gibberellinstandards in den RIAs erklärt auf die Art der Immunogensynthese zurückzuführen.Die unteren

Nachweisgrenzen betragen für den GA_3-EIA 0.5 fMol,für den GA_4-EIA 1 fMol;die Meßbereiche liegen zwischen 1 und 500 fMol (B/B_o = 50% Werte: GA_3 26 fMol,GA_4 13 fMol).Diese Werte zeigen,daß die entwickelten GA-Enzymimmuntests mit die empfindlichsten bisher bekannten immunologischen Nachweisverfahren sind (vgl.SCHUURS und van WEEMEN,1977),verglichen mit anderen physikalisch-chemischen Analyseverfahren besitzen sie um zwei bis drei Größenordnungen niedrigere Nachweisgrenzen (s.REEVE und CROZIER,1980,bzw.Tabelle 25).

Die unspezifischen Bindungen (GA_3-EIA:UB = 10%;GA_4-EIA: UB = 15%) sind bei den Enzymimmuntests vergleichsweise höher als die für die Radioimmuntests ermittelten (unter 1%);dies geht einher mit einer etwas höheren Präzision der RIAs (Variationskoeffizienten von Triplettbestimmungen ca.4% gegenüber 5-6%).Daß die unspezifische Bindung im GA_4-Test höher ist als im GA_3-Test,kann mit der geringeren Polarität der GA_4 und der daher möglicherweise höheren unspezifischen Adsorption an die feste Phase erklärt werden.Für diese Theorie spricht auch,daß die UB-Werte im GA_4-EIA ohne Waschen der Polystyrolplatten nach der Antigen-Antikörperreaktion mit einem Detergenz (Tween 20)noch wesentlich höher lagen.

Hinsichtlich der Spezifität unterscheiden sich die GA-Radioimmuntests nicht grundsätzlich von den GA-Enzymimmuntests.Die Spezifität ist abhängig von der Affinität der Antikörper zu antigenen Determinanten des Haptens,die wiederum vorwiegend durch die Art der Kopplung an das Protein bedingt ist (LANDSTEINER,1945;ERLANGER,1980). Im Fall der an RSA gekoppelten Gibberelline sind alle funktionellen Gruppen außer der Carboxylgruppe chemisch nicht modifiziert worden und können als antigene Determinanten dienen,da sie sich sämtlich in einem größeren Abstand zur Kopplungsgruppe befinden.Die Affinitätskonstanten der einzelnen Immuntests liegen in vergleichbaren Größenordnungen und demonstrieren die hohe Affinität (K_a ca. 10^{10} l/Mol) der Antikörper zu den markierten Antigenen.

Aus den Resultaten der Kreuzreaktionen von den Antigenen strukturverwandten Verbindungen mit den einzelnen Antiseren (Tabelle 8) lassen sich folgende charakteristische Eigenschaften der Antikörper ableiten:Moleküle mit grundlegenden Unterschieden zum ent-Gibberellangerüst (Abbildung 1) zeigen keine Kreuzreaktionen.Das gleiche gilt für alle Gibberelline,die nicht den Lactonring von C_4 nach C_{10} aufweisen (C_{20}-Gibberelline),bzw. für Gibberinsäure und Derivate.Auch Gibberellinkonjugate zeigen keine Bindung an die Antikörper,was allerdings nur am Beispiel des GA_8-Glucosids demonstriert werden konnte.Die Mehrzahl der bisher in höheren Pflanzen identifizierten Gibberellinkonjugate sind entweder GA-O(2)-ß-D-Glucoside,GA-O(3)-ß-D-Glucoside oder aber GA-ß-D-Glucosylester (vgl.GRAEBE und ROPERS,1978;BEARDER,1980).Letztere carboxylgebundenen Konjugate könnten durchaus höhere Kreuzreaktionen zeigen, da die Carboxylgruppe wie schon erwähnt keine antigene Determinante ist.Falls in ausreichenden Mengen verfügbar sollten solche Derivate zur Vervollständigung des Spezifitätsbildes ebenfalls auf Kreuzreaktion getestet werden.

Die Kreuzreaktionen der Antiseren mit Gibberellinen,die mit den Antigenen strukturverwandter sind als die bereits erwähnten Substanzen,lassen einen Zusammenhang der Spezifitäten mit der Polarität der Gibberellinantigene erkennen: Das Antiserum mit der höchsten Spezifität ist das im GA_9-RIA verwendete.GA_9 besitzt keine funktionelle Gruppe, die als antigene Determinante dienen könnte,denn die Carboxylgruppe diente zur Verknüpfung mit dem Protein bei der Immunogensynthese und die exozyklische Doppelbindung in Ring D ist allen auf Kreuzreaktionen getesteten Gibberellinen gemeinsam.Das Auftreten einer einzigen Hydroxylgruppe bei den Reaktanden hat bereits eine fast hundertprozentige Diskriminierung von GA_9 durch die Antikörper zur Folge.

Bei den Radio- und Enzymimmuntests für die höher polaren Gibberelline A_3 und A_4 ist bereits eine geringere Spezifität der Antiseren zu beobachten.Die Antikörperpopulationen im $GA_{4/7}$-Serum sind vorwiegend spezifisch im Bereich von Ring C und D,aber etwas weniger spezifisch für im Bereich des A-Rings beheimatete funktionelle Gruppen.Dagegen bestehen die in den GA_3-Immuntests eingesetzen Antiseren aus Populationen,die jeweils einen Teilbereich,nämlich vorwiegend Substitutionsmuster entweder in Ring A oder aber in Ring D erkennen (vgl. KR von GA_7 und GA_{20} !).Diese Heterogenität tritt verstärkt im GA_1-Serum auf, das immerhin mit acht Gibberellinen 10% oder höhere Kreuzreaktion zeigt.

Eine spezifische GA-Analyse im Rohextrakt ohne vorherige Trennung der Gibberelline erlaubt demnach nur der GA_9-RIA. Für alle anderen Immuntests ist eine Trennung der am höchsten kreuzreagierenden Gibberelline vor den Bestimmungen notwendig.Die verwendete Trennmethode,nämlich die Dünnschichtchromatographie,kann dies aber nicht für alle GAs leisten.Zur selektiven Bestimmung eines Gibberellins ist daher noch der kombinierte Einsatz von Immuntests unter Einrechnung der jeweiligen Kreuzreaktion notwendig (wie in Kapitel III.4.2. ausführlich erklärt),wobei Kontrollversuche die Anwendbarkeit und Präzision der Methode bestätigten.

Für die praktische Anwendung ist ein polyspezifisches Antiserum keineswegs generell von Nachteil:Es kann nämlich, wie im Falle des GA_1-RIA,einen ersten Überblick über das Vorkommen der wichtigsten physiologisch aktiven Gibberelline in einem Pflanzenextrakt geben,so daß die Zahl der weiteren zur Analyse spezifischer GAs erforderlichen Immuntests eingrenzbar ist.

Die Grenze der Leistungsfähigkeit dieser Methode wäre aber dann erreicht,wenn im zu analysierenden Pflanzenmaterial z.B. GA_4,GA_7,GA_5 und GA_{20} in vergleichsweise hohen Mengen enthalten sind,denn eine effektive Auftrennung aller dieser Substanzen aus einem Gemisch mit Hilfe der angewandten Dünnschichtchromatographie ist nicht möglich (vgl.R_f-Werte

in Tabelle 2),und Berechnungen über die unterschiedlichen Kreuzreaktionen würden dann zu aufwendig und wahrscheinlich nicht präzise genug sein.Eine Verbesserung der Spezifität der Analysen könnte z.B. durch eine Kombination der zwar empfindlichsten,aber (wie gesehen) nicht immer die erwünschte Spezifität erreichenden Nachweismethode,nämlich dem Immuntest,mit der bisher leistungsfähigsten Separierungsmethode, der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC),im Bereich der Gibberellinanalytik (REEVE und CROZIER,1978;YAMAGUSHI et al.,1982) erreicht werden.Die zweite sich anbietende Möglichkeit zur Verbesserung der Spezifität ist der Einsatz monoklonaler Antikörper (KÖHLER und MILSTEIN,1975).Dies würde eine spezifische Analyse jeweils eines Gibberellins im Rohextrakt ohne jede vorherige Reinigung erlauben.

Vergleicht man die entwickelten Immuntests bezüglich Empfindlichkeit,Spezifität und experimentellem Aufwand mit den bisher vorherrschenden Methoden der Gibberellinanalytik (vgl.Tabelle 31),so sind sie sämtlichen herkömmlichen Analyseverfahren weit überlegen:Die Radioimmuntests erreichen zwar nicht die Nachweigrenze der SICM-Methode (z.B.GASKIN und MacMILLAN,1978),aber diese Analysetechnik erfordert viele aufwendige Reinigungsschritte.Das hat zur Folge,daß zum einen wegen der auftretenden Verluste eine exakte Quantifizierung der Gibberelline schwierig ist.Andererseits erlaubt der große apparative und zeitliche Aufwand der Methode bei weitem nicht die große Anzahl von Analysen in wenigen Tagen,wie sie mit den Immuntests üblich ist. Das gleiche gilt für die herkömmliche GC-MS-Technik,die zudem weniger sensitiv als die Immuntests ist.Unempfindlicher sind auch die aufgeführten Biotestverfahren,wobei diese wegen der Variabilität des physiologischen Systems und daraus folgender mangelhafter Spezifität und Reproduzierbarkeit (vgl.REEVE und CROZIER,1980) eigentlich nicht als quantitative Bestimmungsmethoden anzusehen sind.Der Vorteil der Immuntests ist also weniger in der jeweils höchsten Qualität der aufgeführten Einzelkriterien zu sehen,sondern in der Summe der Anforderungen,die an ein Analyseverfahren gestellt werden sollte.

Tabelle 31 : Übersicht über Methoden der Gibberellinanalyse

Methode	Reinigungsverfahren	Derivatisierung der Gibberelline	Nachweisgrenze (Mol)	Literaturbeispiele
1.Biotest	DC	keine	3×10^{-12}	McCOMB und CARR,1958 FRANKLAND und WAREING,1960 NICHOLLS und PALEG,1963
2.GC-MS	DC,HPLC und andere chromatographische Verfahren	Methylester-TMSI-Äther TMSI-Ester-TMSI-Äther	1.5×10^{-13}	MacMILLAN et al.,1967 MacMILLAN,1972 REEVE und CROZIER,1978
3.SICM (GC-MS)	wie 2.	wie 2.	1.5×10^{-14}	GASKIN und MacMILLAN,1978
4.RIA				
a) ^{125}J	DC	Methylester	8.5×10^{-15}	WEILER und WIECZOREK,1981
b) ^{3}H	DC	Methylester	7×10^{-14}	diese Arbeit
5.EIA	DC	Methylester	5×10^{-15}	diese Arbeit

Mit den entwickelten Radio- und Enzymimmuntests für Gibberelline und den bereits verfügbaren immunologischen Bestimmungsverfahren für andere pflanzliche Wuchsstoffe (vgl.WEILER,1982 b) ist die Voraussetzung geschaffen worden, Regulationssysteme in höheren Pflanzen,die möglicherweise von verschiedenen Phytohormonen kontrolliert werden,in wesentlich umfassenderem Maße als bisher möglich zu untersuchen.Es existieren eine Reihe von klassischen Beispielen für die hormonelle Steuerung physiologischer Vorgänge in höheren Pflanzen,die in vielen Lehrbüchern als gegeben festgeschrieben sind (vgl.LETHAM et al.,1978),obwohl sie vielfach auf indirekten Beweisführungen oder auf Ergebnissen umstrittener Meßmethoden wie Biotests (vgl.REEVE und CROZIER,1980) basieren.Ein erster Schritt zu neuen Erkenntnissen in der Physiologie pflanzlicher Wuchsstoffe ist daher schon die Anwendung einer leistungsfähigen Analytik auf ihre "klassischen" Modelle.

Ein solches Modell ist die während der Keimung in Gerstenkaryopsen postulierte Steuerung der Synthese und Sekretion hydrolytischer Enzyme,insbesondere der α-Amylase,durch Gibberelline:

Nachdem die Notwendigkeit des Embryos zur Induktion der α-Amylase in keimenden Gerstenkaryopsen festgestellt wurde (z.B. KIRSOP und POLLOCK,1958;McLEOD und PALMER,1962), wurde im Embryo nach dem induktiven Faktor gesucht.Da exogen appliziertes Gibberellin in inkubierten Endospermhälften die Wirkung des Embryos auf die Aktivität der α-Amylase ersetzen konnte (PALEG,1960) und mit Biotestbestimmungen (z.B. YOMO,1960;Mc LEOD und PALMER,1966), die allerdings nicht klären konnten,ob es sich um GA_1 oder GA_3 handelte,Gibberellinaktivität im Embryo gefunden wurde,setzte sich allgemein die Annahme durch,daß Gibberellin die einzig wirksame Substanz zur Induktion der α-Amylase sei.Lediglich darüber,daß dieses Enzym in der Aleuronschicht synthetisiert wurde,lagen Daten vor (CHRISPEELS und VARNER,1967 a;FILNER und VARNER,1967).

Aus der Erkenntnis hingegen,daß zu inkubierten Endospermhälften applizierte ABA die Aktivität der α-Amylase hemmt und dieser Effekt offensichtlich im untersuchten System der GA-Wirkung übergeordnet ist (CHRISPEELS und VARNER,1967 b),wurden vorerst nicht die in entsprechende Experimente mündenden Schlüsse gezogen:Es ist nämlich bisher nichts von endogenen Messungen der ABA in keimenden Gerstenkaryopsen bzw. in ihren Aleuronschichten bekannt.

Auch Gibberelline sind in keimenden Gerstenkaryopsen selten gemessen worden,zu den wenigen publizierten Daten gehören die Resultate von GROAT und BRIGGS (1969):Die Autoren fanden wenige Stunden vor dem Anstieg der α-Amylase ein Maximum der Gibberellinaktivität unter Inkubationsbedingungen für die Gerstenkaryopsen (Hordeum distichon L.cv.Proctor),die dem Mälzen in derBrauindustrie entsprechen,d.h. bei 14.4°C unter Wasserlimitierung.Dies sollte eine Überlagerung der eigentlichen Keimung mit der Induktion der α-Amylase verhindern.Bei normalem Keimungsbedingungen (T =25°C)lag das Maximum der Enzymaktivität zeitlich vor dem der Gibberellinaktivität. Untersuchungen über diese widersprüchlichen Erkenntnisse wurden weiter nicht gemacht.Aus den Versuchen ging auch nicht eindeutig hervor,ob es sich bei der gefundenen Gibberellinaktivität um GA_1 oder GA_3 handelte.Darüber gingen auch die Meinungen von Autoren auseinander,die mit Hilfe von Biotests Gibberellinaktivitäten in isolierten Embryonen fanden:Während RADLEY (1967,1969)der Auffassung war,es handele sich um GA_1,glaubten andere Experimentatoren,GA_3 zu identifizieren (z.B.COHEN und PALEG, 1967).Aus diesen wenigen und widersprüchlichen Ergebnissen formierte sich eine Theorie,die auch in neueren Übersichtsartikeln (vgl.TOMOS undLAIDMAN,1979;AKAZAWA und MIYATA,1982) nie grundsätzlich in Frage gestellt wurde.

Mit Hilfe der Immuntests war es möglich,einen Überblick über Vorkommen,Verteilung und gehaltliche Veränderungen der Phytohormone während der Keimung in Gerstenkaryopsen zu bekommen.Die Beziehung des Hormonhaushaltes zur Aktivität der α-Amylase stand dabei im Vordergrund der Untersuchungen.

Aufgrund der ersten Ergebnisse bei Hordeum vulgare L.cv. Himalaya,in Bochum 1978 geerntet,wurden detailiertere Untersuchungen zum Haushalt der Gibberelline und der Abscisinsäure durchgeführt (vgl.Abb.21).Sie zeigten für beide Fällen eine signifikante Veränderung der Hormonspiegel während der Keimungsprozesse,was nicht für die ebenfalls analysierten Cytokinine bzw. IES zutraf.Ein maximaler Gibberellingehalt und ein niedriger ABA -Spiegel waren wenige Stunden vor Anstieg der α-Amylaseaktivität festzustellen.Bedeutsam ist in diesem Zusammenhang,daß bei exogener Applikation von ABA bzw.Gibberellinen zu Endospermhälften die Induktion der α-Amylase beeinflußt werden kann:Daraus folgten weitergehende Untersuchungen, die für die oben genannte Gerstensorte Indizien für eine positive Kontolle der α-Amylase durch in der Aleuronschicht synthetisiertes Gibberellin und eine negative Kontrolle durch ABA erbrachten.

In Vorversuchen waren geeignete Versuchsbedingunen ermittelt worden:Hordeum vulgare L.cv.Himalaya (Bochum 1978) war zu Beginn der Experimente als einzige Sorte verfügbar.Die Karyopsen keimten optimal bei ca.14^{0}C unter sterilen Bedingungen auf feuchtem Filterpapier im Dunkeln. Da es nicht auszuschließen ist,daß Mikroorganismen Gibberelline produzieren können,mußten sterile Bedingungen gewährleistet sein,um einer möglichen Verfälschung der Analysewerte vorzubeugen.Es wurde mit Kontrollversuchen sichergestellt (Kapitel III.5.1.1.),daß die Karyopsen weder an der Oberfläche noch subepidermal mit Mikroorganismen kontaminiert waren.Die Keimungstemperatur

von 14°C wurde gewählt,um in dieser Hinsicht vergleichbare Bedingungen mit den von GROAT und BRIGGS (1969) durchgeführten Versuchen zu haben;zudem keimten die Karyopsen bei dieser Temperatur am uniformsten.Durch Verwendung radioaktiv markierter Gibberellinstandards in den einzelnen Aufarbeitungsschritten (Kapitel III.4.2. bzw. 5.1.1.) waren Verluste bei der Behandlung des Pflanzenmaterials berechenbar,die Wiederfinderaten (80 - 90%) wurden bei der Berechnung der Endwerte berücksichtigt.

In den methanolischen Extrakten gekeimter und ungekeimter Karyopsen von Hordeum vulgare L.cv.Himalaya (Bochum 1978) wurde neben GA_1,GA_3,GA_4 und GA_7 (Abbildung 21) auch.GA_9 in geringen Mengen (0.3 pMol /Karyopse) immunologisch nachgewiesen.Ungekeimte Karyopsen enthalten vorwiegend GA_1 neben etwas geringeren Mengen von GA_4 und GA_3.GA_4,GA_7 und GA_9 sind bisher noch nicht in Gerstenkaryopsen identifiziert worden,während GA_1 und GA_3 bereits mit Biotestmethoden gefunden wurden (RADLEY, 1967;bzw.GROAT und BRIGGS,1969 ,und COHEN und Paleg,1967). In der auf Abbildung 21 dargestellten Keimungskinetik ist zu sehen,daß kurz nach Beginn der Keimung (ca. sechs Stunden) der GA_1-Gehalt sich verdoppelt hat,im Laufe der Keimung aber stetig absinkt;das Absinken des Gehalts ist bei der in geringeren Mengen als GA_1 im keimenden Korn vorkommenden GA_3 gleichfalls zu beobachten,Mit dem Anstieg der α-Amylaseaktivität auf ein Maximum nach 60 Stunden korreliert also keine signifikante Gehaltsveränderung der beiden GAs.Dagegen ist Abbildung 21 weiter zu entnehmen,daß GA_4 kurz vor dem Anstieg der Aktivität des Enzyms die höchsten Werte erreicht.In vergleichbaren Versuchen fanden GROAT und BRIGGS (1969) mit Biotestmessungen 18 Stunden vor dem Maximum der α-Amylase die höchsten Gibberellinaktivitäten,wobei es sich aber keineswegs um GA_4 handeln konnte,da das im Biotest aktive Material nur Cochromatographie mit GA_1 bzw.GA_3 zeigte und das

bei der Dünnschichtchromatographie verwendete Laufmittel die Trennung der GA_4 von GA_1 und GA_3 ermöglicht.Der Befund, daß vor dem Anstieg der α-Amylaseaktivität ein maximaler Gibberellinspiegel in der Karyopse zu finden ist,ist also bei beiden Experimenten gleich,unterschiedlich ist die Natur des jeweils dominierenden Gibberellins.Die Ergebnisse des Immuntests beweisen aber,daß außer GA_4 keins der anderen physiologisch aktiven Gibberelline für das gefundene Maximum verantwortlich ist.Berechnet man aus den auf Abbildung 21 gezeigten Daten die Steigerungsrate der α-Amylaseaktivität und vergleicht diese mit der Veränderung des GA_4-Gehalts ,so ist zwischen 24 und 36 Stunden nach Beginn der Keimung eine zeitliche Verzögerung der Syntheserate des Enzyms zum Anstieg des GA_4-Gehalts von ca. zwei Stunden zu erkennen;die maximale Syntheserate der α-Amylase ist etwa vier bis fünf Stunden nach dem gemessenen höchsten GA_4-Gehalt erreicht.Die enge zeitliche Korrelation der Kinetiken von GA_4 und α-Amylase aktivität war ein erstes Indiz dafür,daß die Induktion der α-Amylase in einem ursächlichen Zusammenhang mit dem endogenen GA_4-Spiegel steht.

Das Verteilungsmuster der Gibberelline in Endosperm und Embryo (Abbildung 22) läßt erkennen,das zur Zeit des maximalen GA_4-Gehaltes mehr als 80% des Hormons im Endosperm akkumuliert.Messungen in der Aleuronschicht (Tabelle 20) ergaben,daß über 60% der im Korn vorkommenden GA_4 nach 48 Stunden in der Aleuronschicht lokalisiert sind. Eine Akkumulation der anderen analysierten Gibberelline zu diesem Zeitpunkt in Endosperm bzw.Aleuronschicht konnte nicht festgestellt werden.

In Tabelle 20 sind neben der prozentualen Verteilung von GA_4 in der Karyopse auch die Konzentrationen (bezogen auf mg Frischgewicht) zu verschiedenen Zeiten nach Beginn der Keimung aufgeführt .Die GA_4-Konzentration ist zu jeder Zeit im Embryo höher als im Stärkeendosperm ,aber geringer als in der Aleuronschicht.Einer postulierten Diffusion

des für die Induktion der α-Amylase maßgeblichen Gibberellins (s.BRIGGS,1973;YOMO und VARNER,1971) von Embryo ins Stärkeendosperm widersprechen die Daten nicht.Die Aufnahme in die Aleuronschicht könnte dann möglicherweise im Falle der GA_4 im betrachteten Objekt durch einen wie auch immer gearteten aktiven Transportmechanismus erfolgen.

Die nach Inkubation isolierter Embryonen (Abbildung 28) vorgenommenen GA-Bestimmungen mit dem Immuntest in den Präparaten und im Medium ergaben,daß der Anteil der GA_1 am immunreaktiven Material 70 -80% beträgt.Es sind nur vergleichsweise geringe Mengen GA_4meßbar.Um die hohen GA_4-Gehalte nach 48 Stunden Keimung in der Aleuronschicht auf eine Diffusion aus dem Embryo zurückzuführen,müßte dieser in der Zeit davor entsprechend hohe Mengen GA_4 enthalten und auch abgeben.Dies ist weder bei den isolierten Embryonen der Fall noch weist im intakten Korn der Embryo zur maßgeblichen Zeit,d.h. ca. 36 Stunden nach Beginn der Keimung,hohe GA_4-Spiegel auf.Der Zeitpunkt,bis zu dem im intakten Korn die Anwesenheit des Embryos notwendig für die Induktion der α-Amylase ist,beträgt in der untersuchten Gerstenvarietät 24 - 36 Stunden nach Beginn der Keimung (Abbildung 28).Dies stimmt z.B. mit Befunden von McLEOD und PALMER (1966) überein.Die in der Aleuronschicht akkumulierte GA_4 wird also in dem Inkubationsexperiment nicht vom Embryo abgegeben;ein Vergleich der dort gemessenen Werte mit denen im Embryo des intakten Korns muß zu dem Schluß führen,daß die in der Aleuronschicht akkumulierten GA_4-Spiegel nicht aus dem Embryo stammen.

Es ist denkbar,daß die im Embryo in vergleichsweise hohen Mengen gemessene GA_1 in die Aleuronschicht diffundiert und dort zu GA_4 metabolisiert würde. Von den isolierten Embryonen wird,wie Abbildung 28 zeigt,ein Teil der GA_1 ins Medium abgegeben.Da aber (vgl.Kapitel III.5.1. 3) auch ein Abbau der GA_1 im Embryo bzw. im Inkubationsmedium durch aus dem Embryo stammende Enzyme stattfindet, würde nur ein geringer Teil der im Embryo enthaltenen

GA_1 letzendlich in die Aleuronschicht gelangen.Vergleiche der GA_1-Spiegel in isolierten Embryonen mit denen im Embryo keimender Karyopsen (Abbildung 22) bis zur kritischen Zeit,d.h.solange der Embryo zur Induktion der α-Amylase notwendig ist,zeigen eine deutliche quantitative Übereinstimmung.Im intakten Korn ist aber zu dieser Zeit keine Akkumulation von GA_1 im Endosperm zu sehen.Der hohe Gehalt von GA_4 in der Aleuronschicht scheint also nicht auf eine Abgabe von GA_1 aus dem Embryo und eine Umwandlung zu GA_4 im Endosperm zurückzuführen sein.

Eine eindeutige Erklärung für die Akkumulation von GA_4 in der Aleuronschicht geben die in Kapitel III.5.1.4. abgehandelten Experimente zum Einfluß exogen applizierter Gibberelline und GA-Biosyntheseinhibitoren auf GA_4-Gehalt und α-Amylaseaktivität in embryolosen Karyopsen:

Nach Inkubation von Endospermhälften in GA_1- bzw. GA_4-Lösung ist eine hohe α-Amylaseaktivität im Gegensatz zu entsprechenden Kontrollen meßbar (vgl.Tabelle 25).Bei Applikation von GA_1 ist außerdem eine deutliche Erhöhung des endogenen GA_4-Gehaltes zu sehen.Endogene GA_4 und α-Amylase sind aber nach Applikation von GA_1 zusammen mit GA-Biosyntheseinhibitoren nicht mehr meßbar.Eine direkte Unterdrückung der α-Amylasesynthese durch die GA-Biosyntheseinhibitoren ist auszuschließen,denn nach Applikation von GA_1,GA_4 und GA-Biosyntheseinhibitor zusammen hat das Enzym eine gleich hohe Aktivität wie nach Applikation von GA_1 ohne Inhibitor.Die Anwesenheit des Gibberellinhemmstoffs verhindert zwar eine endogene GA_4-Synthese,aber durch gleichzeitige Präsenz von außen zugegebener GA_4 ist die Induktion der α-Amylase in der Endospermhälfte dennoch möglich.Es ist also klar, daß die Induktion der α-Amylase in embryolosen Karyopsen eine Folge endogen nachweisbarer GA_4-Synthese ist.

Dieses Resultat ergibt sich auch aus vergleichenden kinetischen Messungen der α-Amylaseaktivität in Endospermhälften nach Applikation von GA_1 bzw.GA_4 mit einem

GA-Biosyntheseinhibitor (vgl.Abbildung 30 :Die applizierte GA_4 induziert das Enzym ca. sechs Stunden früher als die GA_1.Da der Inhibitor die Synthese endogender GA_4 ausschließt,ist die Zeitdifferenz nur damit zu erklären, daß nach GA_1-Zugabe zur Induktion der α-Amylase GA_4-Synthese notwendig ist,die wie Abbildung 30 ebenfalls ausweist,auch meßbar war.Das Maximum des GA_4-Gehaltes geht dem Anstieg der α-Amylaseaktivität dabei zeitlich voraus.

Die Möglichkeit,daß die im Endosperm meßbare GA_4 ein Metabolit der applizierten GA_1 ist,kann ausgeschlossen werden;dies zeigten Fütterungsversuche mit radioaktiv markierter GA_1 an Endospermhälften (vgl.Kapitel III.5.1.4.). Radioaktiv markierte GA_4 wird in nichtinduktiven Mengen (0.24 pMol/Karyopse) gefüttert ebenfalls nicht metabolisiert (Abbildung 32).Daraus kann geschlossen werden,das sie nicht eine Vorstufe des Induktors der α-Amylase ist, sondern selbst direkt induziert.Daß die endogen gemessene GA_4 aus Konjugaten stammt,ist nach den Resultaten der enzymatischen Spaltung von Gibberellinkonjugaten in intakten Karyopsen unwahrscheinlich (vgl.Kapitel III.5.1.5.).

Der Ort der α-Amylasesynthese ist wie schon bekannt (FILNER und VARNER,1967;CHRISPEELS und VARNER,1967 a) die Aleuronschicht.Versuche mit isolierten Aleuronschichten,denen Gibberelline und GA-Biosyntheseinhibitoren analog den Experimenten mit embryolosen Karyopsen appliziert wurden (Tabelle 13,Abbildung 31),zeigten,daß endogene GA_4-Synthese und α-Amylasesynthese in gleichem ursächlichen Zusammenhang stehen,so daß daraus geschlossen werden muß,daß der Ort der GA_4-Bildung in der Aleuronschicht zu suchen ist.

Wie die zusätzlich erhobenen Daten belegen,können die aus dem Hormonhaushalt der 1978 in Bochum angebauten und geernteten Sorte von Hordeum vulgare L.cv.Himalaya gezogenen Schlußfolgerungen nicht auf andere Varietäten übertragen werden,diese Varianten können,was die Regulation der α-Amylase betrifft,in drei Gruppen eingeteilt werden:

Die in Bochum 1982 geerntete und mit Saatgut aus Bochum von 1978 angezogene Sorte von Hordeum vulgare L.cv:Himalaya die in England (1978,1981,1982) geernteten Himalaaasorten und die Varietäten von Hordeum vulgare L.cv.Nordal und Hordeum distichon L.cv.Proctor enthalten nur geringe Mengen GA_4.Die α-Amylase erreicht ihre höchste Aktivität nach fünf Tagen Keimung,nach 4 Tagen ist ein maximaler Gehalt an GA_1 meßbar,die zu mehr als 60% in der Aleuronschicht lokalisiert ist (Abbildungen 23-26).GA_3 ist ebenfalls nur in geringen Mengen meßbar.Die Vermutung liegt nahe,daß GA_1 in diesen Gerstenvariettäten die Funktion von GA_4 zukommt.

Hordeum vulgare L.cv.Himalaya (Pullman,1980) zeigte vergleichbare Amylaseaktivität wie andere Varietäten (vgl.Abbildung 25). Es waren aber nur relativ geringe Mengen der mit den Immuntests analysierbaren Gibberelline zu sehen,Diese Varietät ist die bisher einzige,die Amylaseaktivität zeigt,ohne daß es mit einer signifikanten Veränderung des GA-Gehaltes einhergeht.

Ein anderes Regulationssystem scheint es bei zwei Sorten von Hordeum vulgare L.cv.Clipper zu geben;In Induktionsversuchen konnte von NICHOLLS 1982 gezeigt werden,daß ohne GA_3 inkubierte Endospermhälften eine gleich hohe α-Amylaseaktivität besaßen wie hormonbehandelte Präparate.Diese Experimente konnten reproduziert werden.Immunologische Analysen keimender Karyopsen (Abbildung 27) zeigten,daß schon im ruhenden Korn ein vergleichsweise hoher GA-Gehalt meßbar war,der im Verlauf der Keimung konstant blieb (ca 2.5 pMol/Karyopse).Die α-Amylase stieg in diesem vom Autor als "on"-Typ (Kapitel III.5.1.2.2.) bezeichneten Objekt wesentlich früher an als in dem verglichenen "off"-Typ.

Außerdem war in der letzteren Sorte die α-Amylase nur mit GA induzierbar. Der Induktionsversuch mit dem "on"-Typ bedeutet, daß die Anwesenheit des Embryos zu keiner Zeit notwendig für die Induktion der α-Amylase ist. Damit korreliert, daß von Anfang an in großen Mengen GA_1 im Endosperm lokalisiert ist und der Anstieg der α-Amylase vergleichsweise früher einsetzt. "On " und "off"-Typ wurden mit demselben Saatgut angezogen, verschieden waren lediglich die Anbaubedingungen (Langtag und hohe Temperatur gegenüber Kurztag und tiefer Temperatur. Das Beispiel zeigt, daß auch äußere Faktoren eine grundsätzliche Veränderung eines Regulationssystems in keimenden Gerstenkaryopsen bewirken können.

Festzuhalten bleibt, daß das in der Literatur bisher sehr einheitlich interpretierte Modell einer Hormonwirkung auf die Regulation hydrolytischer Enzyme nach intensiver immunologischer Analyse eine Reihe von Widersprüchen aufweist: Es ist weder generell festzustellen, daß der Embryo für die Induktion der α-Amlase notwendig ist, noch ist die Hypothese einer Diffusion von GA in die Aleuronschicht zur Induktion des Enzyms zu verallgemeinern. In den Fällen, wo Messungen mit den Immuntests einen Zusammenhang zwischen endogenem Gibberellingehalt und der α-Amylase denkbar erscheinen lassen, dominieren mengenmäßig zwei verschiedene Gibberelline. Schließlich ist ein Beispiel dafür anzuführen, daß GA endogen in großen Mengen für die Induktion der α-Amylase überhaupt nicht notwendig ist.

Mit diesn widersprüchlichen Befunden bezüglich der Rolle der Gibberelline kontrastiert ein sehr einheitliches Bild des endogenen Musters von Abscisinsäure und ihrer C_1-gebundenen Konjugate in sämtlichen untersuchten Varietäten der Gerste. Die beiden ausgewählten Beispiele, repräsentativ für alle anderen analysierten sind, demonstrieren die Keimungskinetiken auf Abbildung 35:

Im ruhenden Korn ist ein vergleichsweise hoher Spiegel freier ABA meßbar.Er sinkt im Laufe der Keimung schon nach wenigen Stunden ab und erreicht sein Minimum wenige Stunden vor dem Anstieg der α-Amylaseaktivitä.Zu diesem Zeitpunkt weisen die meisten untersuchten Varietäten einen erhöhten Gibberellingehalt auf.Fast spiegelbildlich zum Abfall der freien ABA stieg die Menge der Konjugate an. Dieser Vorgang ist in ganzen Karyopsen zu beobachten,aber auch in den untersuchten Karyopsenteilen ,wo der Effekt zuerst im Embryo auftritt und wenige Stunden später im Endosperm.Dabei kann man aus den Ergebnissen sowohl eine Umwandlung der ABA zu Konjugaten als auch eine teilweise Diffusion ins Endosperm und dort stattfindenden Metabolismus schließen.

Ein Einfluß der ABA auf zwei verschiedene physiologische Vorgänge ist denkbar:Zum einen ein inhibierender auf die Induktion der Amylase.Die Ergebnisse von Induktionsvesuchen mit Hordeum vulgare L.cv.Himalaya, Bochum 1978 bestätigen diesen Befund,außerdem ist ein spezifischer Hemmeffekt auf die endogene GA_4-Synthese (ca.60%) zusehen,der allerdings geringer ist als die Hemmung der Amylase (95%)Die inhibierende Wirkung der ABA auf die Synthese der α-Amylase ist also einerseits direkter Natur ,in dem Falle,wo GA_4 ein Induktor des Enzyms ist,hemmt die ABA indirekt,indem sie die Synthese endogender GA unterdrückt.
Die relativ geringe Zahl der Analysen im Vergleich zu den Gibberellinbestimmungen ,die vorgenommen wurden, sollte weitergehende Interpretationen zunächst ausschließen.

Der zweite Effekt der ABA,nämlich auf die Keimung,wurde etwas intensiver untersucht.Dazu wurden Gerstenkaryopsen in ABA-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen

inkubiert,wobei 100% Keimungshemmung bei Applikation von 10^{-5} M ABA auftritt.Mit isolierten Embryonen wurde das gleiche Resultat erhalten.Die immunologischen Analysen von ABA und Konjugaten wurden schon beschrieben (vgl. Abbildung 35).Es bleibt noch einmal festzuhalten,daß die drastischsten Veränderungen im immunologisch analysierbaren Metabolismus der ABA in den frühen Keimungsstadien zu registrieren sind.

Mit den radioaktiv markierten Derivaten der ABA wurden Fütterungsexperimente an isolierte Embryonen durchgeführt (cgl.Abbildung 36),um darüber Aufschluß zu erhalten,ob ABA außer zu Konjugaten auch zu Phaseinsäure oder Dihydrophaseinsäure,wie sie DASHEK et al.(1979) bzw.HO und UKNES (1982) bei Fütterung von ^{14}C- bzw.^{3}H-ABA an isolierte Aleuronschichten identifizieren konnten,umgebaut wird.[2] Es konnten polare Konjugate,die z.T.mit dem ABA-ß-D-glucopyranosylester cochromatographierten,und Phaseinsäure identifiziert werden.Die Konjugate machten ca.5o% aller auf dem Chromatogramm zu messenden radioaktiven Metaboliten aus. Die Ergebnisse lassen darauf schließen,daß es mehrere Möglichkeiten der Inaktivierung der ABA gibt. Daraus läßt sich folgern:Die vergleichsweise hohen ABA-Gehalte in ungekeimten Gerstenkaryopsen scheinen als physiologische Bremse zu wirken,die eine Keimung verhindern kann.Bei Beginn der Quellung wird die freie ABA in C_1-Konjugate und wahrscheinlich Phaseinsäure umgebaut.Der Prozeß beginnt im Embryo.

Die Tatsache,daß die Umwandlung von radioaktiv markierter ABA qualitativ vergleichbar in isolierten Embryonen und in isolierten Aleuronschichten zu beobachten ist, läßt eine Hemmwirkung der ABA endogen auf zwei räumlich, zeitlich und funktionell verschiedene Vorgänge in Gerstenkaryopsen vermuten:Auf die Keimung und auf die Induktion der α-Amylase.Hinsichtlich der α-Amylase sollte untersucht werden,ob die freie ABA möglicherweise aus dem Embryo in die Aleuronschicht diffundiert und dort die

Synthese hydrolytischer Enzyme so lange hemmt,bis z.B. der Embryo die zu mobilisierenden Reservestoffe aus dem Endosperm benötigt.

V. Zusammenfassung

1. Für GA_1, GA_3, und GA_9 wurden Radioimmuntests entwickelt. Für die Tests von GA_3 und GA_9 war hierzu die Synthese radioaktiv markierter Antigene notwendig. Diese wurden erhalten durch Derivatisierung der Gibberelline zu ihren 17-Norketonen und anschließender Markierung mit NaB^3H_4. Die spezifischen Aktivitäten für die radioaktiven Derivate betrugen ca. 5 Ci/mMol und ermöglichten den empfindlichen Nachweis von GA_3 und GA_9 (Meßbereiche zwischen 0.7 und 5 pMol). Die gleiche Sensitivität erreichte ein RIA, für den [1,2-^{3}H]-GA_1 als markiertes Antigen eingesetzt wurde.

2. Die in den Enzymimmuntests für GA_3 und GA_4 durch Kopplung der Gibberelline an alkalische Phosphatase erhaltenen markierten Antigene gewährleisten mit spezifischen Aktivitäten von 15 bzw. 12 U/nMol die Durchführung äußerst sensitiver Tests mit Meßbereichen zwischen 1 und 500 fMol und Nachweisgrenzen zwischen 0.5 bis 1 fMol. Zum Aufbau der Enzymimmuntest wurden außerdem GA_3-und $GA_{4/7}$-Proteinkonjugate synthetisiert, die spezifische Antikörper induzierten.

3. Die einzelnen Radio- und Enzymimmuntests weisen unterschiedliche Spezifitäten auf. Mit Hilfe des GA_9-RIA können spezifische Analysen von GA_9 auch in pflanzlichen Rohextrakten durchgeführt werden. Für den spezifischen Nachweis der anderen Gibberelline ist eine dünnschichtchromatographische Reinigung der Extrakte und der kombinierte Einsatz von Immuntests unterschiedlicher Spezifitäten nötig. Die Methode ermöglicht aber neben der spezifischen Analyse von GA_1, GA_3, GA_4 und GA_9 auch den Nachweis von GA_7 und GA_{20}. Die Immuntests weisen hinreichende Genauigkeit und Reproduzierbarkeit auf.

4. In Extrakten keimender Gerstenkaryopsen konnten GA_1, GA_3, GA_4, GA_7 und GA_9 identifiziert werden. In den meisten analysierten Gerstenvarietäten trat während der Keimung ein Maximum der Gibberellinaktivität auf, dem wenige Stunden danach ein Anstieg der Aktivität der α-Amylase folgte. Zur Zeit der maximalen Gibberellinspiegel waren je nach Varietät GA_1 und GA_4 zu mehr als 60% in den Aleuronschichten lokalisiert.

5. In Hordeum vulgare L.cv.Himalaya (Ernte Bochum 1978) konnte nach Applikation von GA_1 zu vom Embryo getrennten Karyopsen eine endogene GA_4-Synthese in der Aleuronschicht nachgewiesen werden, die eine Voraussetzung für die Induktion der α-Amylase war. Der Befund korrelierte mit einem hohen GA_4-Gehalt in den Aleuronschichten keimender Karyopsen kurz vor Anstieg der α-Amylaseaktivität.

6. In Hordeum vulgare L.cv.Clipper konnte bei einer Sorte, die auch ohne Anwesenheit des Embryos bzw. ohne applizierte GA zur Synthese der α-Amylase in der Lage ist, gezeigt werden, daß dieser Befund mit einem vergleichsweise hohen Gibberellinspiegel im ruhenden Korn und einer sehr früh einsetzenden Synthese der α-Amylase in keimenden Karyopsen korrelierte.

7. Neben Gerstenvarietäten, für die signifikante Veränderungen des GA-Gehaltes eine Voraussetzung für die Induktion der α-Amylase in keimenden Karyopsen zu sein scheinen, wurde mit Hordeum vulgare L.cv.Himalaya (Pullman 1980) eine Varietät gefunden, bei der ein Anstieg der Aktivität der α-Amylase nicht mit einer deutlichen Veränderung des endogenen Gibberellingehaltes einhergeht.

8. In allen untersuchten Gerstenvarietäten war in frühen Phasen der Keimung ein Metabolismus endogener Abscisinsäure zu ihren C_1-gebundenen Konjugaten immunologisch meßbar. Ferner konnte bei Applikation tritiummarkierter ABA zu Gerstenkaryopsen ein Umbau zu polaren Verbindungen und mit Phaseinsäure cochromatographierenden Derivaten gemessen werden. Der endogene ABA-Spiegel im ruhenden Korn ist vergleichsweise hoch und verringert sich kurz nach der Quellung rapide. Dieser Prozeß ist zuerst im Embryo meßbar.

9. ABA in 10^{-4}M Konzentrationen inhibiert bei Applikation die Keimung von Gerstenkaryopsen.

10. Abscisinsäure hemmt bei Applikation zu Endospermhälften die Synthese der α-Amylase in der Aleuronschicht. Neben dieser Hemmwirkung ist auch in Endospermhälften von Hordeum vulgare L.cv. Himalaya, Ernte Bochum 1978, eine Unterdrückung der endogenen GA_4-Synthese zu beobachten.

Literaturverzeichnis

AKAZAWA,T.,MIYATA,S.: Biosynthesis and Secretion of α-Amylase and Other Hydrolases in Germinating Cereal Seeds.
In: Essays in Biochemistry Vol.18,Campbell,P.N., Marshall,R.D. (eds.),Academic Press,London (1982).

ARENS, H.: Aufstellung und Anwendung eines Radioimmunassays für Serpentin und Raubasin.
Diplomarbeit, Bochum 1976

BAILISS,K.W.,HILL,T.A.: Biological Assays for Gibberellins.
Bot.Rev. 37 (1971),437-479.

BEARDER, J.R.: Plant Hormones and Other Growth Substances. - Their Background, Structures and Occurence. in: Hormonal Regulation of Development I. Molecular Aspects of Plant Hormones.
J. MacMILLAN (ed.), Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1980), pp. 9-93.

BERSON, S.A., YALOW, R.S.: Recent Studies on Insulin-Binding Antiboties.
Ann. N.Y.Acad. Sci. 82. (1959), 338-344

BINKS, R. ; GOODFELLOW, R.I.; MacMILLAN, J.; PRYCE, R.J.: Octyl Tri-n-butyl Citrate, a. Common Laboratory Contaminant.
Chem. Ind. (Lond.) (1970), 565-566

BINKS, R.; CLEAVER, R.L. ; LITTLER, I.S. ; MacMILLAN, J.: Real - Time Processing of Low Resolution Mass Spectra.
Chem. Brit. 7 (1971), 8-12

BRIGGS, D.E.: Residues from Organic Solvents Showing Gibberellin-Like Biological Activity
Nature 210 (1966), 419-421

BRIGGS, D.E.: Modified Assay for α-Amylase in Germinating Barley.
J. Inst. Brew. 73 (1967), 361-370

BRIGGS, D.E.: Hormones and Carbohydrate Metabolism in Germinating Cereal Grains.
In: Biosynthesis and Its Control in Plants, Milborrow, B.V. (ed.), Academic Press, New York (1973), pp. 219-277

BROWN, A.H.D., JACOBSEN, J.V.: Genetic Basis and Natural Variation of α-Amylase Isoenzymes in Barley
Genet. Res. Camb. 40 (1982), 315-324

CAVELL, B.D.; MacMILLAN, J.; PRYCE, R.J.; SHEPPARD, A.C.: Thin-Layer and Gas-Liquid Chromatography of the Gibberellins; Direct Identification of the Gibberellins in a Crude Plant Extract by Gas-Liquid Chromatography.
Phytochemistry 6 (1967), 867-874

CHARD, T.: An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques.
North-Holland Publishing Company, Amsterdam - New York - Oxford (1978).

CHERVU, L.R.; MURTY, D.R.K.: Radiolabeling of Antigens: Procedures and Assessment of Properties.
In: Radioimmunoassay, Freeman, L.M., Blaufox, M.D. (eds.), New York (1975), pp. 38-48.

CHRISPEELS, M.I.; VARNER, J.E.: Inhibition of Gibberellic Acid Induced Formation of α-Amylase by Abscisin II
Nature 212 (1966), 1066-1067.

CHRISPEELS, M.I.; VARNER, J.E.: Gibberellic Acid-Enhanced Synthesis and Release of α-Amylase and Ribonuclease by Isolated Barley Aleurone Layers
Plant Physiol 42 (1967a), 398-406

CHRISPEELS, M.I.; VARNER, J.E.: Hormonal Control of Enzyme Synthesis: On the Mode of Action of Gibberellic Acid and Abscisin in Aleurone Layers of Barley
Plant Physiol 42 (1967b), 1008-1016.

COHEN, D.; PALEG, L.G.: Physiological Effects of Gibberellic Acid. The Release of Gibberellin-Like Substances by Germinating Barley Embryos.
Plant Physiol. 42 (1967), 1288-1296.

COOK, B.: Automation and Data Processing for Radioimmunoassays.
In: Steroid Immunoassay. Cameron, E.H.D., HILLIER, S.G.; GRIFFITHS, K. (eds.), Cardiff (1975), pp. 133-140.

COOMBE, B.G.; COHEN, D.; PALEG, L.G.: Barley Endosperm Bioassay for Gibberellins: II Application of the Method.
Plant Physiol. 42 (1967), 113-119.

CROSS,B.E.,GALT,R.H.B.,HANSON,J.R.: The Biosynthesis of the Gibberellins.Part I. (-)-Kaurene as a Precursor of Gibberellic Acid.
J.Chem.Soc.(1964),296-300

CROSS, B.E.; GROVE, J.F., MacMILLAN, J.; MOFFATT, J.S.: MULHOLLAND, T.P.C.; SEATON, J.C., SHEPPARD,N.: A Revised Structure for Gibberellic Acid.Proc. Chem. Soc. (1959), 302-303.

DASHEK, W.V.; SINGH, B.N.; WALTON, O.C.: Abscisic Acid Localization and Metabolism in Barley Aleurone Layers.
Plant Physiol. 64 (1979), 43-48.

DATHE, W.; SEMBDNER, G.: Distribution of Gibberellins and Abscisic Acid in Different Fruit Parts of Rye (Secale cereale L.). Gibberellins LXVII.
Biochem. Physiol. Pflanzen 173 (1978), 440-447.

DENNIS, F.G.; MARTIN, G.C.; BASKIN, P.; MacMILLAN, J.: Gibberellins in Mature Apple Seeds - Contaminantes?
Planta 147 (1980), 376-377.

DURLEY,R.C.,PHARIS,R.P.: Interconversion of Gibberellin A_4 to Gibberellin A_1 and A_{34} by Dwarf Rice,Cultivar Tan-ginbozu.
Planta 109 (1973),357-361.

ECKERT, H.G.: Die Technik des Radioimmunoassays
Angew. Chem. 88 (1976), 565-574.

ENGVALL, E.: Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT.
Meth. Enzymol. 80 (1980), 419-438.

ENGVALL,E.,PERLMANN,P.: Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).Quantitative Assay of Immunoglobulin G.
Immunochemistry 8 (1971),871-874.

ERLANGER, B.F.: Principles and Methods for the Preparation of Drug Protein Conjugates for Immunological Studies.
Pharmacol. Rev. 25 (1973), 271-280.

ERLANGER, B.F.: The Preparation of Antigenic Hapten-Carrier Conjugates: A Survey.
Meth. Enzymol., 70 (1980), 85-103.

ERLANGER, B.F.; BOREK, F.; BEISER, S.M.; LIEBERMANN, S.: Steroid-Protein Conjugates. 1. Preparation and Characterization of Conjugates of Bovin Serum Albumin with Testosterone and with Cortisone
J. Biol. Chem. 228 (1957), 713-727.

EXLEY, D.; JOHNSON, M.W.; DEAN, P.D.G.: Antiserums Highly Spezific for 17 B-Estradiol.
Steroids 18 (1971), 605-620.

FILNER, F.; VARNER, J.E.: A Test for de novo Synthesis of Enzyme: Density Labeling with H_2O^{18} of Barley α-Amylase induced by Gibberellic Acid.
Proc. Nathl. Acad. Sci. U.S.A. 58 (1967), 1520-1526.

FUCHS, Y.; GERTMAN, E.: Insoluble Antibody Column for Isolation and Quantitative Determination of Gibberellins.
Plant Cell Physiol. 15 (1974), 629-633.

GASKIN, P.; MacMILLAN, J.; FIRN, R.D.; PRYCE, R.I.: "Parafilm": A Convenient Source of n-Alkane Standards for the Determination of Gas Chromatographic Retention Indices.
Phytochemistry 10 (1971), 1155-1157.

GASKIN, P.; MacMILLAN, J.: GC and GS-MS Techniques for Gibberellins.
In: Isolation of Plant Growth Substances, Hillman, I.R. (ed.), Cawbridge University Press, Cambridge (1978), pp. 79-95.

GIBBONS, G.C.: On the Relative Role of the Scutellum and Aleurone in the Production of Hydrolases During Germination of Barley
Carlsberg Res. Commun. 46 (1981), 215-225.

GRAEBE, J.E.; ROPERS, H.J.: Gibberellins
In: Phytohormones and Related Compounds: A Comprehensive Treatise, Vol. I., Letham, D.S., Goodwin, P.D.; Higgins, T.J.V. (eds.), Amsterdam - Oxford - New York: Elsevier/North-Holland, Biomedical Press (1978), pp. 1-28.

GRAEBE, J.E.; HEDDEN, P.; RADEMACHER, W.: Gibberellin Biosynthesis.
In: Gibberellins, Chemistry, Physiology and Use, Lenton, J. R. (ed.), British Plant Regulator Group, Monograph No. 5, London (1980), pp. 31-61.

GROAT, J.I.; BRIGGS, D.E.: Gibberellines and α-Amylase Formation in Germinating Barley.
Phytochemistry 8 (1969), 1615-1627.

GROVE, J.F.; MULHOLLAND, T.P.C.: The Stereochemistry of Allogibberic Acid.
J. Chem. Soc. (1960), 3007-3022.

HABERLAND, G.: Die Kleberschicht des Gras-Endosperm als Diastase ausscheidendes Drüsengewebe.
Ber. Deutsch. Botan. Ges. 8 (1890), 40-48.

HANSON, J.R.: The Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Some Gibberellin Derivatives.
J. Chem. Soc. (1965), 5036-5040.

HIGGINS, T.J.V.; ZWAR, J.A.; JACOBSEN, J.V.: Gibberellic Acid enhances the Level of Translatable mRNA for α-Amylase in Barley Aleurone Layers. Nature 260 (1976), 166-169.

HO, D.T.H.; VARNER, J.E.: Hormonal Control of Messenger Ribonucleic Acid Metabolism in Barley Aleurone Layer. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71 (1974), 4783-4786.

HO, T.D., UKNES, S.I.: Regulation of Abscisic Acid Metabolism in the Aleurone Layers of Barley Seeds. Plant Cell Reports 1 (1982), 270-273.

HURN, B.A.L.; LANDON, J.: Antisera For Radioimmunoassay. In: Radioimmunoassay Methods. KIRKHAM, K.E.; HUNTER, W.M. (eds.), London (1971), pp. 112-142.

HURN, B.A.L.; CHANTLER, S.M.: Production of Reagent Antibodies. Meth. Enzymol. 70 (1980), 104-141.

JACKSON, D.I.: Factors Affecting Response in the Barley Endosperm Bioassay for Gibberellins J. exp. Bot. 22 (1971), 613-619.

JACOBSEN, J.V.; ZWAR, I.A.: Gibberellic Acid causes Increased Synthesis of RNA which contain Poly (A) in Barley Aleurone Tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71 (1974), 3290-3293.

JACOBSEN, J.V.; HIGGINS, T.J.V.: Comparision of the α-Amylases Synthesized by Aleurone Layers of Himalaya Barley in Response to GA_3. Plant Physiology 70 (1982), 1647-1653.

JONES, R.L.: Gibberellins: Their Physiological Role. Ann. Rev. Plant Physiol. 24 (1973), 571-598.

JONES, R.L.; VARNER, J.E.: The Bioassay of Gibberellins. Planta 72 (1967), 155-161.

KABAT, E.A.: Einführung in die Immunchemie und Immunologie. Springer, Berlin (1971).

KARLSON, P.: Was sind Hormone? Der Hormonbegriff in Geschichte und Gegenwart. Naturwissenschaften 69 (1982), 3-14.

KATO, J., KATSUMI, M., TAMURA, S.; SAKURAI, A.: Plant Growth - Regulating Activities of Helminthosporol and its Derivatives. In: Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances, Wightman, F., Setterfield, G. (eds.), Runge Press, Ottawa (1968), pp. 347-359.

KELLIE, A.E.; LICHMAN, K.V.; SAMARAJEEVA, P.: Chemistry of Steroid - Protein Conjugate Formation. In: Steroid Immunoassay. Cameron, E.H.D.; Hillier, S.G.; Griffiths, K. (eds.), Cardiff (1975).

KENDE, H.: Preparation of Radioactive Gibberellin A_1 and its Metabolism in Dwarf Deas. Plant Physiol. 42 (1967), 1612-1618.

KHAN,A.A.,DOWNING,R.D.: Cytokinin Reversal of Abscisic Acid Inhibition and α-Amylase Synthesis in Barley Seed.
Physiol.Plant. 21 (1968),1301-1307.

KHAN, A.A.; TAO, K.: Phytohormes, Seed Dormancy and Germination.
In: Phytohormones and Related Compounds: A Comprehensive Treatise, Vol. II., Letham, D.S., Goodwin, P.D., Higgins, T.J.V. (eds.), Amsterdam - Oxford - New York: Elsevier/North-Holland, Biomedical Press (1978), pp. 371-422.

KHORANA, H.G.: Observations on the Use of Dicyclohexyl Carbodiimide in the Synthesis of Peptids.
Chem. Ind. (Lond.) (1955), 1087-1088.

KIRKWOOD, P.S.; MacMILLAN, J.: Gibberellins A_{60}, A_{61} and A_{62}: Partial Synthesis and Natural Occurence.
J. Chem. Soc. Perkin I (1982), 689-697.

KIRSOP, B.H.; POLLOCK, I.R.A.: Studies in Barley and Malt. XII Interaction between the Embryo and the Endosperm of Barley During Malting.
J. Inst. Brewing 64 (1958), 227-233.

KÖHLER, D.; LANG, A.: Evidence for Substances in Higher Plants Interfering with Response of Dwarf Peas to Gibberellin.
Plant Physiol. 38 (1963), 555-560.

KUSS, E.; GOEBEL, R.; Determination of Estrogens by Radioimmunoassay with Antibodies to Estrogen G6-Conjugates. II Synthesis of 17-Estradiol-6-Albumin-Conjugate.
Steroids 19 (1972), 737-740.

LEHMANN, H.; MIERSCH, O.; SCHÜTTE, H.R.: Synthese von Abscisyl-ß-D-Glucopyranosid.
Z. Chem. 15 (1975), 443.

LETHAM, D.S.; HIGGINS, T.J.V.; GOODWIN, P.B.; JACOBSEN, J.V. Phytohormones in Retrospect.
In: Phytohormones and Related Compounds: A Comprehensive Treatise, Vol. I; Letham, D.S.; Goodwin, P. D.; Higgins, T.J.V. (eds.), Amsterdam-Oxford-New York: Elsevier/North-Holland, Biomedical Press (1978), pp. 1-28.

LEWAK, S.; SINSKA, I.: Comments on the Paper by F.G. Dennis, G.C. Martin, P. Gaskin and I. MacMillan: Gibberellins in Mature Apple Seeds - Contaminants?
Planta 147 (1980), 378.

LIN, J-T.; HEFTMAN, E.: Synthesis of the Labeled Gibberellin GA_9 - 17 - ^{14}C.
J. Labelled Comp. Radiopharm. 16 (1979), 537-545.

MARSCHNER, J.; DOBRY, H.; ERHARDT, F.; LANDERSDORFER, T.; POPP, B.; RINGEL, C.; SCRIBA, P.C.: Berechnung radioimmunolgischer Meßwerte mittels Spline-Funktion.
Ärztl. Lab. 20 (1974), 184-191.

MacMILLAN,J.,SEATON,J.C.,SUTER,P.J.:Isolation of Gibberellin A_1 and Gibberellin A_5 from Phaseolus multiflorus
Tetrahedron 11 (1960),60-66.

MacMILLAN, J.; MOFFATT, J.S.: Butylcellosolve Ester of Gibberellin Acid.
J. Chem. Soc. (1962), 4727-4728.

MacMILLAN, J.; PRYCE, R.J.; EGLINGTON, G.; CORMICK, A.: Identification of Gibberellin in Crude Plant Extracts by Combined Gas Chromatography-Mass Spectrometry.
Tetrahedron Lett. (1967), 2241-2243.

MacMILLAN, J.; TAKAHASHI, N.: Proposed Procedure for the Allocation of Trivial Names to the Gibberellins
Nature 217 (1968), 170-171.

MacMILLAN, J. ; PRYCE, R.J.; The Gibberellins.
In: Phytochemistry, Vol. III, Miller, L.P. (ed.), Van Nostrand-Reinhold, New York (1973), pp. 283-326.

McCOMB, A.J.; CARR, D.J.: Evidence from a Dwarf Pea Bioassay for Naturally Occuring Gibberellins in the Growing Plant.
Nature 181 (1958), 1548-1549.

McCOMB, A.J.: The Control by Gibberellic Acid of Stem Elongation and Flowering in Biennial Plants of Centaurium minus Moench.
Planta 63, (1967), 242-251.

McLEOD, A.M. ; PALMER, G.H.: The Embryo of Barley in Relation to Modification of the Endosperm.
J. Inst. Brew. 72 (1966), 580-589.

McLEOD, A.M. ; PALMER, G.H.: Gibberellin from Barley Embryos.
Nature 216 (1967), 1342-1343.

MERTENS,R.,STÜNING,M.,WEILER,E.W.: Metabolism of Tritiated Enantiomers of Abscisic Acid Prepared by Immunoaffinity Chromatography.
Naturwissenschaften 69 (1982),595-597

MICHNIEWICZ, M.; LANG, A.: Effect of Nine Different Gibberellins on Stem Elongation and Flower Formation in Cold-Requiring and Photoperiodic Plants Grown under Non-Inductive Conditions.
Planta 58 (1962), 549-563.

MIDGLEY, A.R.; HEPBURN, M.R.: Use of the Double-Antibody Method to separate Antibody Bound from Free Ligand in Radioimmunoassay.
Meth. Enzymol. 70 (1980), 266-273.

MILBORROW;B.V.: The Chemistry and Physiology of Abscisic Acid.
Ann.Rev.Plant.Physiol. 25 (1974),259-308

MILBORROW, B.V.: Abscisic Acid.
In: Phytohormones and Relates Compounds: A Comprehensive Treatise, Vol. I; Letham, D.S., Goodwin, P.D., Higgins, T.J.V. (eds.), Amsterdam-Oxford-New York: Elsevier/North-Holland, Biomedical Press (1978), pp. 295-348.

MOZER, T.J.: Control of Protein Synthesis in Barley Aleurone Layers by the Plant Hormones Gibberellic Acid and Abscisic Acid.
Cell 20 (1980), 479-485.

MURPHY, J.P.M.; BRIGGS, D.E.: Gibberellin Estimation and Biosynthesis in Germinating Hordeum distichon.
Phytochemistry 12 (1973), 1299-1308.

NICHOLLS, P.B.: Influence of Temperature during Grain Growth and Ripening of Barley on the Subsequent Response to Exogenous Gibberellic Acid.
Austr. J. Plant Physiol. 9 (1982), 373 - 383.

NICHOLLS, P.B.N.; PALEG, L.G.: A Barley Endosperm Bioassay for Gibberellins.
Nature 199 (1963), 823-824.

NADEAU, R.; RAPPAPORT, L.: The Synthesis of [^{3}H]Gibberellin A_1 by the Palladium-Catalyzed Actions of Carrier - Free Tritium on Gibberellin A_3.
Phytochemistry 13 (1974), 1537-1545.

ODELL, W.D.; SKOWSKI, R.; ABRAHAM, G.; HESCOX, M.; FISHER, D.; GROVER, P.K.: Production of Antisera for Polypeptide and Steroid Radioimmunoassays.
Biology of Reproduction 6 (1972), 427-442.

PALEG, L.G.: Physiological Effects of Gibberellic Acid. II. On Starch Hydrolyzing Enzymes of Barley Endosperm.
Plant Physiol. 35 (1960), 902-906.

PALEG,L.G.: Physiological Effects of Gibberellins.
Ann.Rev.Plant.Physiol. 16 (1965),291-322.

PENGELLY, W.; MEINS, F.: A Specific Radioimmunoassay for Nanogram Quantities of the Auxin, Indole - 3 - acetic Acid.
Planta 136 (1977), 173-180.

RADLEY, M.: Site of Production of Gibberellin-Like Substances in Germinating Barley Embryos.
Planta 75 (1967), 164-171.

RADLEY, M.: The Effect of the Endosperm on the Formation of Gibberellin by Barley Embryos.
Planta 86 (1969), 218-223.

REEVE, D.R.; CROZIER, A.: The Analysis of Gibberellins by High Performance Liquid Chromatography.
In: Isolation of Plant Growth Substances, Hillman, J.R. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge (1978), pp. 41-77.

REEVE, D.R.; CROZIER, A.: Quantitative Analysis of Plant Hormones.
In: Encyclopedia of Plant Physiology, Vol. 9, MacMillan, J. (ed.), Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1980), pp. 41-78.

SHEEHAN, J.C.; HESS, G.P.: A New Method of Forming Peptide Bonds.
J. Am. Chem. Soc. 77 (1955), 1067-1068.

SMITH, K.O.; GEHLE, W.D.: Semiautomation of Immunoassays by Use of Magnetic Transfer Devices.
Meth. Enzymol 70 (1980), 388-419.

STELLNER, K.: Der Radioimmunoassay (RIA), eine universelle Labormethode.
Chemie in unserer Zeit 5 (1977), 143-149.

TAKAHASHI, N.; MUROFUSHI, N.; TAMURA, S.; WASADA, N.; HOSHINO, H.; TSUCHIYA, T.; AOYAMA, T.; MORITA, H.: High Resolution Mass Spectra of Gibberellins.
Tetrahedron Lett. (1967), 895-899.

TAKAHASHI, N.; FUJISAWA, S.; YAMAGUCHI, I.: Qualitative and Semi-Quantitative Analysis of Gibberellins.
Phytochemistry 21 (1982), 2049-2055.

TOMOS, A.D.; LAIDMAN, D.L.: The Control of Mobilization and Metabolism in the Aleurone Tissue During Germination.
In: Recent Advances in the Biochemistry of Cereals Phytochemical Society of Europe, Symposion Series No. 16, Laidman, D.L., Jones, W.R.G., Academic Press, London (1979), pp. 118-145.

TREWAVAS, A.J.: Growth Substance Sensitivity: The Limiting Factor in Plant Development.
Physiol. Plant. 55 (1982), 60-72.

Van WEEMEN,B.,SCHUURS,A.H.W.M.: Immunoassay Using Antigen-Enzyme Conjugates
FEBS Lett.15 (1971),232

WEILER, E.W.: Radioimmunoassay for the Determination of Free and Conjugated Abscisic Acid.
Planta 144 (1979), 255-263.

WEILER, E.W.: Radioimmunoassay for trans-Zeatin and Related Cytokinins.
Planta 149 (1980), 155-162.

WEILER, E.W.: Radioimmunoassay for Picomol Quantities of Indole-3-acetic acid for Use with Highly Stable ^{125}J and ^{3}H-IAA as Radiotracers.
Planta 153 (1981), 319-325.

WEILER, E.W.: An Enzyme-Immunoassay for cis-(+)-Abscisic Acid.
Physiol. Plant 54 (1982), 510-514.

WEILER, E.W.: Plant Hormone Immunoassay.
Physiol. Plant. 54 (1982b), 230-234.

WEILER, E.W.; ZENK, M.H.: Radioimmunoassay for the Determination of Digoxin and Related Compounds in Digitalis lanata.
Phytochemistry 15 (1976), 1537-1545.

WEILER, E.W.; SPANIER, K.: Phytohormones in the Formation of Crown Gall Tumors.
Planta 153 (1981), 326-337.

WEILER, E.W.; WIECZOREK, U.: Determination of Femtomol Quantities of Gibberellic Acid by Radioimmunoassay.
Planta 152 (1981), 159-167.

WEILER, E.W.; JOURDAN, P.S.; CONRAD, W.: Levels of Indole-3-acetic Acid in Intact and Decapitated Coleoptiles as Determined by a Specific and Highly sensitive solid-Phase Enzyme Immunoassay.
Planta 153 (1981), 561-571.

WENT, F.W.; THIMANN, K.V.: Phytohormones.
MacMillan Co. (1937), New York.

WEST, C.A.; PHINNEY, B.O.: Gibberellins from Flowering Plants. I. Isolation and Properties of a Gibberellin from Phaseolus vulgaris L. J. Amer. Chem. Soc. 81 (1959), 2424-2427.

WULFSON, N.S.; ZARETSKII, J.V.; PAPERNAJA, J.B.; SEREBRYAKOV, E.P.; KUCHEROV, V.F.:
Mass Spectrometry of Gibberellins.
Tetrahedron Lett. (1965), 4209-4216.

YABUTA,T.,HAYASHI,T.:Biochemical Studies on "Bakanae" Fungus of Rice.II.Isolation of Gibberellin,the Active Principle which produces Slender Rice Seedlings.
J.Agric.Chem.Soc.(Japan) 15 (1939),257-266

YAMAGUCHI, I.; TAKAHASHI, N.; FUSITA, K.: Application of ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance to the Study of Gibberellins.
J. Chem. Soc. Perkin I (1975), 992-996.

YOMO, H.: Amylase - Activating Substance.
IV. Amylase-Activating Activity of Gibberellin.
Hakko Kyokaishi 18 (1960), 600-602.

YOMO, H.; IINUMA, H.: Production of Gibberellin-Like Substance in the Embryo of Barley during Germination.
Planta 71 (1966), 113-118.

YOMO, H.; VARNER, J.E.: Hormonal Control of Secretory Tissues
In: Current Topics in Developmental Biology, Moscona, A.; Monroy, A.; (eds.), Vol. G. (1971), Academic Press, New York, pp. 111-114.

L e b e n s l a u f

Am 31. Mai 1953 wurde ich,Rainer Atzorn,als Sohn von Theodor Atzorn und Edith Atzorn,geb. Jacob,in Bad Schwalbach geboren.

Von 1960 bis 1964 besuchte ich die Grundschule in Bad Schwalbach-Hettenhain;von 1964 bis 1972 das Diltheygymnasium in Wiesbaden,wo ich am 7. Juni 1972 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1972/73 begann ich mit dem Studium der Germanistik,Vergleichenden Literaturwissenschaft und Publizistik an der Universität Mainz und wechselte im Sommersemester 1973 zur Fachkombination Germanistik und Biologie.

Vom 1.Oktober 1973 bis zum 31.Januar 1975 leistete ich meinen Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz in Wiesbaden ab.

Zum Sommersemester 1975 setzte ich das Studium der beiden letztgenannten Fächer an der Universität Hamburg fort.Zum Wintersemester 1975/76 begann ich an der Ruhruniversität Bochum das Studium der Biologie,wo ich am 9. Mai 1980 die Diplomprüfung im Fach Biologie ablegte.

Im Mai 1980 begann ich am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit unter der Anleitung von Herrn Privatdozent Dr. E.W.Weiler.

Seit dieser Zeit habe ich am selben Lehrstuhl eine Stelle als wissenschaftliche Hilfskraft inne.

Meinen ganz persönlichen Dank möchte ich
Herrn Privatdozent Dr. E.W.Weiler für
die Überlassung des Themas,sein reges
Interesse am Fortgang der Untersuchungen
und seine große Unterstützung aussprechen.

Weiter danke ich Herrn H. Winking
für die Anfertigung der vielen
Abbildungen.